

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Mecanismos emergentes de resistencia a antibióticos en
enterobacterias de origen humano, animal y ambiental**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Martínez Ovejero

Director

Bruno González Zorn

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

Mecanismos emergentes de resistencia a antibióticos en enterobacterias de origen humano, animal y ambiental

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR

Cristina Martínez Ovejero

Bajo la dirección del Profesor

Bruno González Zorn

Madrid, 2017



D. Bruno González Zorn, Profesor Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM),

CERTIFICO:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Mecanismos emergentes de resistencia a antibióticos en enterobacterias de origen humano, animal y ambiental”** presentada por Doña Cristina Martínez Ovejero, Licenciada en Veterinaria y Máster en Investigación en Ciencias Veterinarias por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo mi dirección en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y cumple con todos los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Por ello y de acuerdo con la normativa vigente, informo favorablemente para que proceda a su defensa y presentación.

Madrid, abril de 2017

Fdo.: Dr. Bruno González Zorn

A mis padres

Agradecimientos

A mis padres que siempre me han apoyado y han estado a mi lado.

A Pablo un apoyo fundamental durante todo este periodo.

A mi labo, lo mejor de esta tesis!



ÍNDICE

Imagen: Leeuwenhoek con su microscopio. Pintura de Ernest Board (1877–1934).

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE | 11 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 14 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 15 |
| ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS Y TÉRMINOS LATINOS Y ANGLOSAJONES..... | 16 |
| RESUMEN | 19 |
| SUMMARY..... | 23 |
| INTRODUCCIÓN | 29 |
| I. ANTIBIÓTICOS, RESISTENCIAS Y CONCEPTO <i>ONE HEALTH</i>..... | 29 |
| II. TETRACICLINAS | 33 |
| 2.1 Origen..... | 33 |
| 2.2 Estructura química..... | 34 |
| 2.3 Mecanismo de acción | 36 |
| 2.4 Clasificación, propiedades y efectos adversos | 37 |
| 2.5 Uso | 38 |
| 2.5.1 Medicina humana..... | 39 |
| 2.5.2 Medicina veterinaria | 39 |
| 2.5.3 Agricultura..... | 39 |
| 2.6 Mecanismos de resistencia | 40 |
| 2.6.1 Bombas de eflujo específicas | 40 |
| 2.6.2 Protección ribosomal | 41 |
| 2.6.3. Otros mecanismos..... | 41 |
| 2.6.3.1 Inactivación enzimática..... | 41 |
| 2.6.3.2 Mecanismos de resistencia inespecíficos..... | 42 |
| 2.7 Tigeciclina, la nueva tetraciclina | 42 |
| 2.7.1 Características específicas..... | 42 |
| 2.7.2 Aplicaciones terapéuticas | 43 |
| 2.7.3. Mecanismos de resistencia | 44 |
| 2.7.3.1 Resistencia mediada por bombas de eflujo multisustrato..... | 44 |

| | |
|---|----|
| III. AMINOGLUCÓSIDOS | 47 |
| 3.1 Descubrimiento y desarrollo | 47 |
| 3.2 Estructura química y clasificación | 49 |
| 3.2.1 Aminoglucósidos típicos..... | 49 |
| 3.2.2 Aminoglucósidos atípicos..... | 50 |
| 3.3 Mecanismo de acción | 51 |
| 3.4 Propiedades y toxicidad | 52 |
| 3.5 Uso | 54 |
| 3.5.1 Medicina humana..... | 54 |
| 3.5.2 Medicina veterinaria y agrícola | 55 |
| 3.6 Mecanismos de resistencia | 55 |
| 3.6.1. Reducción de la concentración intracelular de los aminoglucósidos | 56 |
| 3.6.2. Modificación enzimática de la estructura de los aminoglucósidos..... | 56 |
| 3.6.3. Modificación de la diana de actuación de los aminoglucósidos | 57 |
| 3.6.3.1 Metilaciones post-transcripcionales del ARNr 16S | 57 |
| 3.6.3.1.1. <i>Metiltransferasas adquiridas</i> | 58 |
| IV. COLISTINA | 61 |
| 4.1 Historia de las polimixinas | 61 |
| 4.2 Estructura y clasificación de las polimixinas | 62 |
| 4.3 Mecanismo de acción de las polimixinas | 63 |
| 4.4 Propiedades | 64 |
| 4.5 Toxicidad | 65 |
| 4.5 Usos | 66 |
| 4.5.1 Uso clínico en medicina humana..... | 66 |
| 3.5.2 Medicina veterinaria | 67 |
| 4.6 Mecanismos de resistencia a colistina | 68 |
| 4.6.1. Modificación de los LPS..... | 69 |
| 4.6.2. Resistencia a colistina mediada por plásmidos: genes <i>mcr</i> | 70 |
| OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN | 75 |
| RESULTADOS | 79 |
| CAPÍTULO I | 81 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST11 and ST147 highly resistant to tigecycline from companion animals..... | 81 |

| | |
|---|------------|
| ABSTRACT | 83 |
| INTRODUCTION | 84 |
| MATERIALS AND METHODS | 86 |
| RESULTS..... | 89 |
| DISCUSSION | 94 |
| CAPÍTULO II | 97 |
| Whole genome sequencing reveals the dissemination of high risk clones and the evolution of their multidrug resistance plasmids in an Indian Hospital | 97 |
| ABSTRACT | 99 |
| INTRODUCTION | 100 |
| METHODS | 101 |
| RESULTS..... | 105 |
| DISCUSSION | 130 |
| CAPÍTULO III | 131 |
| Spread of <i>mcr-1</i>-carrying <i>Enterobacteriaceae</i> in sewage water from Spain | 131 |
| ABSTRACT | 133 |
| INTRODUCTION | 134 |
| MATERIALS AND METHODS | 135 |
| RESULTS..... | 138 |
| DISCUSSION | 141 |
| DISCUSIÓN | 145 |
| 1. Origen de la resistencia a tigeciclina en animales de compañía. | 146 |
| 2. ¿Estamos ante la presencia de un nuevo mecanismo cromosómico de resistencia a tigeciclina?..... | 147 |
| 3. La fosfomicina, el gen silenciado..... | 148 |
| 4. <i>mcr-1</i> , de las aguas residuales a los ríos..... | 148 |
| 5. Clones multirresistentes, exitosos y epidémicos en la India..... | 149 |
| 6. Problemas en la detección de genes de resistencia..... | 149 |
| CONCLUSIONES..... | 153 |
| CONCLUSIONS..... | 155 |
| BIBLIOGRAFÍA | 181 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Cronograma comparativo de la comercialización de los antibióticos y la aparición de resistencias..... | 31 |
| Figura 2. Principales miembros de uso clínico de la familia de las tetraciclinas..... | 34 |
| Figura 3. Estructura química común de las tetraciclinas. | 35 |
| Figura 4. Mecanismos de resistencia a tetraciclinas..... | 40 |
| Figura 5. Estructura de las familias de bombas de eflujo multisustrato implicadas en la resistencia a tigeciclina..... | 45 |
| Figura 6. Estructura química de los aminoglucósidos más relevantes en la práctica clínica humana, veterinaria y en agricultura..... | 48 |
| Figura 7. Resumen de los posibles efectos tóxicos producidos por la administración de aminoglucósidos..... | 53 |
| Figura 8. Estructura química de la polimixina B y la colistina | 62 |
| Figura 9. Mecanismo de acción de las polimixinas | 64 |
| Figura 10. Principales usos de la colistina en medicina humana y veterinaria..... | 68 |
| Figura 11. Representación de los principales genes implicados en el mecanismo de resistencia a colistina por modificación de la estructura de los LPS..... | 70 |
| Figura 12. Distribución mundial de <i>mcr-1</i> procedente de aislados humanos, ambientales, de alimentos y de animales de producción | 72 |
| Figura 13. Population Snapshot of <i>K. pneumoniae</i> | 90 |
| Figura 14. PFGE of S1 nuclease digestion. | 91 |
| Figura 15. Expressions levels of efflux pumps, usually involve in tigecycline resistance in <i>K. pneumoniae</i> , determined by qRT-PCR..... | 93 |
| Figura 16. Core Genome MLST of our clinical isolates..... | 124 |
| Figura 17. Percentage of prevalence of resistance genes identified via Resfinder (98% identity threshold)..... | 125 |
| Figura 18. Nucleotide alignment of the 5'UTR region upstream to <i>fosA</i> | 126 |
| Figura 19. Amino acid alignment of <i>fosA</i> | 127 |
| Figura 20. Schematic maps of predominant plasmids..... | 128 |
| Figura 21. Different genetic organization of the resistome from plasmid IncFII and its prevalence between the isolates of cluster F | 129 |
| Figura 22. A map of the metropolitan area of Barcelona showing the seven different waste-water plants. Each treatment plant collects the sewage from one specific area.. | 136 |
| Figura 23. Dendrogram of the 29 <i>E. coli</i> positive to <i>mcr-1</i> | 140 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas. | 36 |
| Tabla 2. Clasificación de los aminoglucósidos en base a su estructura química. | 50 |
| Tabla 3. Características de todas las metiltransferasas y sus variedades descubiertas hasta la fecha..... | 60 |
| Tabla 4. List of primers used in this study..... | 88 |
| Tabla 5. MIC of strains from this study against several antibiotics. | 89 |
| Tabla 6. Clinical and phylogenetic data of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates. | 109 |
| Tabla 7. MIC of the 54 clinical isolates..... | 110 |
| Tabla 8. Resistance genes and plasmid incompatibility groups of clinical isolates identified via Resfinder (98% threshold) PlasmidFinder (100% threshold) | 112 |
| Tabla 9. Resistance genes identified by Resfinder with an identity of at least 98%..... | 115 |
| Tabla 10. Data of the plasmid-carrying 16S rRNA methylase of the 54 clinical isolates..... | 116 |
| Tabla 11. Gene content of the predominant plasmids via RAST annotation. | 117 |
| Tabla 12. SNPs variation analysis of the three predominant plasmids. | 123 |
| Tabla 13. Epidemiological data and MICs of the 30 isolates positive for <i>mcr-1</i> obtained from sewage plants in Barcelona, Spain. | 139 |
| Tabla 14. Patógenos considerados por la OMS de prioridad máxima en la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos para combatirlas..... | 145 |

ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS Y TÉRMINOS LATINOS Y ANGLOSAJONES

- 2-DOS** 2-desoxiestreptaminos
AAC Acetiltransferasas
ADN Ácido desoxiribonucleico
ANT Nucleotidiltransferasas
APH Fosfotransferasas
Arm *Aminoglycoside resistance methyltransferase*
ARN Ácido ribonucleico
ARNm ARN mensajero
ARNr ARN ribosómico
ARNt ARN transferente
ARNtm ARN transferente-mensajero
ATP Adenosín trifosfato
CLSI *Clinical and Laboratory Standard Institute*
CMI Concentración Mínima Inhibitoria
ESBLs β -lactamasas de espectro extendido
et al. Del latín *et alii*, 'y otros'
In vitro Del latín, 'en vidrio'; empleado para referirse a un experimento realizado en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.
MFS *Major Facilitator Superfamily*
mg/L Miligramos/litro
Pam *Panaminoglycoside resistance methyltransferase*
pH Potencial de hidrógeno
pKa Potencial de disociación de un ácido
RND *Resistant Nodular Division*
versus Del latín, 'ir hacia' aunque empleada por los ingleses para expresar confrontación 'contra'
wt *Wild type*



RESUMEN

Imagen: Foto tomada en 1944 que muestra como la penicilina era producida en masa, situandose el pico de producción diario en 15.000 viales.

RESUMEN

La introducción de los antibióticos en la práctica clínica supuso una auténtica revolución en la medicina. Su utilización no solo sirvió para convertir a una de las principales causas de muerte del siglo XX, las enfermedades infecciosas, en enfermedades curables, si no que propició el avance de la medicina y la cirugía. Por todo ello, los antibióticos han permitido el alcance de hitos médicos que han mejorado sustancialmente la calidad de vida de las personas, permitiendo el aumento de la esperanza de vida. No obstante, poco tiempo después de empezar a utilizarse los antibióticos, se observó la aparición de bacterias capaces de sobrevivir al efecto antibacteriano de los mismos. En principio, la aparición de estas resistencias antimicrobianas fue una consecuencia natural asociada al uso de los antibióticos. Sin embargo, a raíz de su uso incorrecto e indiscriminado, tanto en medicina humana, veterinaria como en agricultura, este fenómeno natural se aceleró de tal forma, que la velocidad de aparición de las resistencias superó la velocidad de descubrimiento de nuevas moléculas antimicrobianas. Consecuentemente, la situación actual a nivel mundial es crítica, puesto que nos enfrentamos a patógenos que son capaces de resistir a la totalidad de antibióticos disponibles, lo cual amenaza con acercarnos a la era post-antibiótica.

Para poder frenar el avance de las resistencias, es necesario conocer cómo éstas evolucionan y se transmiten, con el fin de predecir la emergencia de nuevos medios de propagación y de nuevos mecanismos de resistencia. Las resistencias no se circunscriben a un determinado nicho, sino que son capaces de seleccionarse, evolucionar y diseminarse entre distintos ambientes. Además hay que tener en cuenta que los antibióticos que se usan en medicina humana, son los mismos que se utilizan en medicina veterinaria y en agricultura, si bien es cierto que actualmente en animales de abasto y en agricultura, su uso está más regulado y solo se pueden utilizar antibióticos que hayan sido autorizados. Es por tanto fundamental para conocer la verdadera ecología de los mecanismos de resistencia, estudiarlos, no solo en el ámbito de la medicina humana, sino también en el animal y en el ambiental.

Las tetraciclinas, los aminoglucósidos y las polimixinas son un claro ejemplo de familias de antibióticos que están siendo utilizadas en salud pública, sanidad animal e incluso en agricultura. Algunos miembros de estas familias, como la tigeciclina o la colistina, forman parte de los antibióticos de último recurso, denominados de esta manera para fomentar que su

utilización se restrinja al tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes. Por lo tanto, el estudio y caracterización de los mecanismos de resistencia a estos antibióticos, en el ámbito animal, ambiental y humano, es fundamental para desarrollar medidas de prevención del avance de las resistencias y preservar la funcionalidad de estos antibióticos de tremenda importancia para la salud humana.

Las enterobacterias son una familia de bacterias capaces de producir infecciones tanto en animales como en el ser humano. Son una de las principales causas de enfermedades nosocomiales. La aparición enterobacterias resistentes a antibióticos de importancia clínica está incrementándose, de tal manera que su asociación con betalactamasas de espectro ampliado o carbapenemasas las sitúa dentro de las bacterias más peligrosas.

Por este motivo, el objetivo de esta tesis doctoral es la identificación y caracterización de mecanismos de resistencia frente a antibióticos de importancia clínica, presentes en enterobacterias aisladas de animales de compañía, del medio ambiente y de pacientes hospitalizados.

La tigeciclina, el primer y único miembro de la nueva clase de tetraciclinas, las glicilciclinas, cuyo uso está restringido al ámbito hospitalario en medicina humana, como terapia de elección para el tratamiento de determinadas infecciones (piel, intraabdominales, neumonías) causadas por bacterias multirresistentes. Su principal mecanismo de resistencia es la sobreexpresión de bombas de eflujo, que extruyen el antibiótico al exterior celular impidiendo que alcance su diana de actuación, el ribosoma bacteriano. Hasta ahora, la resistencia a tigeciclina siempre había sido descrita en aislados clínicos procedentes de muestras humanas. Sin embargo, en esta tesis doctoral describimos los primeros aislados resistentes a tigeciclina obtenidos de cepas animales, concretamente dos *Klebsiella pneumoniae* aisladas de la orina de dos perros. Pese a ser aislados de animales de compañía, los sequence types a los que pertenecen las dos cepas indican, que ambas cepas son clones mundialmente distribuidos de origen humano. El mecanismo involucrado en la resistencia a tigeciclina es una bomba de eflujo, no obstante, no es la principal bomba responsable de la resistencia a tigeciclina en *K. pneumoniae*. La identificación de estos dos aislados de origen humano en animales, pone de manifestación la transmisión y adaptación de clones entre nichos. Al mismo tiempo abre nuevas vías de diseminación para la resistencia a tigeciclina, lo cual favorecerá a incrementar la velocidad de propagación de la misma.

Los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos de gran importancia clínica, principalmente se utilizan en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram

negativas, aunque también por Gram positivas. Existen varios mecanismos que confieren resistencia a aminoglucósidos, entre los cuales destacan las metiltransferasas del ARNr 16S, debido a que confieren un elevado nivel de resistencia a prácticamente todos los aminoglucósidos disponibles en la práctica clínica. Además, estas enzimas suelen ir acompañadas de otros genes que confieren resistencia a otros antibióticos como betalactámicos o carbapenemas. En esta tesis doctoral quisimos estudiar como evolucionaban las bacterias y los plásmidos que portaban estas metiltransferasas dentro de un hospital en India, con el fin de poder desarrollar métodos de detección rápida que sirvieran para frenar su diseminación. Para ello, llevamos a cabo técnicas de secuenciación masiva sobre, 54 aislados clínicos obtenidos de muestras humanas, y sus transformantes, portadores del plásmido asociado a metilasas. Nuestros resultados identificaron la presencia de dos clones predominantes diseminados por todo el hospital. Uno de ellos más reciente por la escasa variabilidad observada tanto en el núcleo de la bacteria como el plásmido. El otro también mostraba escasa variabilidad en el núcleo bacteriano pero sin embargo su plásmido era mucho más variable. Todos los aislados tenían en su genoma el gen *fosA* pese a que eran susceptibles a fosfomicina, (todos excepto uno). La fosfomicina, que es un antibiótico que aún no se comercializa en India, se quiere introducir con el fin de ser utilizada en el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos multirresistentes, debido a los bajos niveles de resistencia que se han observado. Sin embargo, como resaltamos en esta tesis, las bacterias multirresistentes pueden tener genes de resistencia a fosfomicina silenciados, que mediante mutaciones pueden revertir la susceptibilidad fácilmente, y acabar con la funcionalidad de la fosfomicina.

El reciente descubrimiento del primer mecanismo de resistencia a colistina mediado por plásmidos, *mcr-1*, generó gran preocupación en la comunidad médica. Hasta entonces, la resistencia a colistina había sido mediada por mecanismos cromosómicos, de transmisión únicamente vertical, y por tanto, más lenta. Sin embargo, la diseminación de resistencia a colistina mediada por plásmidos, podía incrementar la ineficacia de la colistina en el tratamiento de infecciones, y puesto que este antibiótico se utiliza como último recurso, supondría la falta de opciones terapéuticas. Desde que se identificó *mcr-1*, este gen y sus variaciones han sido identificados en multitud de cepas de origen humano, animal y en alimentos. No obstante, han sido muy escasos los aislados portadores del gen, procedentes del medio ambiente, lo cual sugería que *mcr-1* se encontraba circulando confinado al mundo animal y humano. En esta tesis doctoral identificamos un amplio número de enterobacterias procedentes de aguas residuales previas al tratamiento, obtenidas de distintas plantas depuradoras de la ciudad de Barcelona. El análisis filogenético de las mismas reveló la existencia de dos clones *E. coli* predominantes, que

proveían de ambas plantas depuradoras, demostrando que ambos clones se encuentran circulando entre la población sana de Barcelona. Asimismo, la presencia de *mcr-1* en bacterias procedentes de estaciones de tratamiento de aguas depuradoras, implica la liberación directa de estos clones al medio ambiente. Sorprendentemente, uno de los aislados portadores de *mcr-1* no presentaba fenotipo de resistencia de colistina, sin embargo, su transformante sí exhibía fenotipo de resistencia a colistina. De nuevo, observamos un fenómeno de silenciación de genes, lo cual dificulta su detección y favorece su diseminación.

Como conclusión, esta tesis ayuda a tener un mayor conocimiento, sobre la evolución y vías de propagación de mecanismos de resistencia relevantes para la salud pública. Dicho conocimiento podrá ser utilizado para adoptar medidas de control, que ayuden a frenar el avance de las resistencias antimicrobianas, y predecir la emergencia de nuevos mecanismos de resistencia y sus vías de diseminación.

SUMMARY

The inclusion of antibiotics in clinical practice lead to a major revolution in medicine. Their use not only made infectious diseases curable, one of the main death causes of the 20th Century, but also enabled great advances in medicine and surgery. Ergo, antibiotics have helped achieve medical milestones which have substantially improved human quality of life, and increased life expectancy. Albeit, shortly after starting using them, it was observed how certain bacteria were surviving the antibiotics. At first it was thought that this antibacterial resistance was a natural consequence, linked to the use of antibiotics. However, due to the incorrect and indiscriminate use of antibiotics in human medicine, veterinary and agriculture, this natural phenomenon sped up in such way that the rate of resistance overcame that of the discovery of new antibiotic molecules. Consequently, the current worldwide situation is critical, as we are fighting pathogens which are able to resist the totality of available antibiotics, and threatens to put an end to the antibiotic era.

In order to be able to stop the advance of antibiotic resistance, it is necessary to understand how it evolves and transmits, with the goal of predicting the emergence of new resistance mechanisms. Resistances are not circumscribed to a certain niche, as they are able to discriminate, evolve and disseminate among different environments. It's important to bear in mind that antibiotics are also used in veterinary medicine and agriculture, where their use is on the other hand more strictly regulated, and only those authorized can be used. It is fundamental, therefore, to study resistance mechanisms in order to understand their true ecology not only in human medicine, but in animals and environments.

Tetracyclines, aminoglycosides and polymyxins are clear examples of antibiotic families used in public healthcare. Some of these family members, like tigecycline or colistin, are part of the last resort antibiotics, named this way to promote their restricted use in treatment for infections caused by multiresistant microorganism. The study and characterization of the resistance mechanisms towards these antibiotics is therefore fundamental in the animal, environmental and human scopes, towards developing progress-preventing measures, and preserving the effectiveness of these tremendously important antibiotics for human health.

Enterobacteria are a family of bacteria capable of producing infections in both humans and animals. They are one of the main causes for nosocomial disease. The appearance of enterobacteria, resistant to relevant clinical antibiotics, is increasing in such a way that their association to betalactamasas of amplified spectrum, or carbapenemasas, positions them as one of the most dangerous bacteria.

Because of this, the goal of the present doctoral thesis is the identification and characterization of resistance mechanisms against clinically important antibiotics, present in enterobacteria isolated from domestic animals, from the environment, and from hospitalized patients.

Tigecycline is the first and only member of the new tetracycline class, glycylines, and is restricted to hospital scopes in human medicine as selective therapy for certain infection treatments (skin, intraabdominal and pneumonia) caused by multiresistant bacteria. Its main resistance mechanism is the overexpression of efflux pumps, which extrude the antibiotic to the cell exterior, preventing it from acting in its target, the bacterial ribosome. Up until now, resistance to tigecycline had always been described in clinical isolates from human samples. In this doctoral thesis we describe the first tigecycline resistant isolates, belonging to animal strains; specifically two *Klebsiella pneumoniae* isolates from the urine of two different dogs. Even though the isolates came from domestic animals, the sequence types to which both strains belong indicate that they are human originated clones that have been globally distributed. The mechanism involved in the resistance to tigecycline consists of an efflux pump, but this is not the main pump responsible for tigecycline in *K. pneumoniae*. The identification of these two isolates of human origin in animals, is evidence of the transmission and adaptation of clones between niches. At the same time, it opens new dissemination gateways for tigecycline resistance, which would help increase its propagation speed.

Aminoglycosides are an antibiotic group of great clinical relevance, mainly used for infections caused by negative Gram bacteria, although also for those caused by positive Gram bacteria. There are several mechanisms granting resistance to aminoglycosides, among which methyltransferases from ARNr 16S outstands, due to its empowering of high resistance levels to all aminoglycosides available in clinical practice. These enzymes are usually also joined by other genes which grant resistance to other antibiotics such as betalactams or carbapenems. For this doctoral thesis, our goal was to study how these bacteria and plasmids, carrying the methyltransferases, evolved inside a hospital in India. Our goal was to develop quick detection methods which would allow to slow down their dissemination. We carried out massive

sequencing techniques across 54 clinical isolates, obtained from human samples, and their transformants, carriers of the methylases-linked plasmids. Our results identified the presence of two predominant clones which had been disseminated across the whole hospital. One of them was newer because of the low variation observed in both the bacteria's core and plasmid. The other one also displayed low variation in its bacterial core, but had a much more variable plasmid. All of the isolates had the *fosA* gene in their genome, even while most were susceptible to fosfomycin (all except one). Fosfomycin, an antibiotic which is yet to be commercialized in India, is intended to be made available in order to be applied for treatment of infections produced by multiresistant microorganisms, due to the low levels of resistance which have been observed. Even so, as we highlight in this thesis, multiresistant bacteria can carry silent fosfomycin resistance genes, which can easily revert the susceptibility by means of mutations, putting an end to the effectiveness of fosfomycin.

The recent discovery of *mcr-1*, the first colistin resistance mechanism mediated by plasmids, generated a great concern among the medical community. Up until then, colistin resistance had been mediated by chromosomal mechanisms, of vertical transmission exclusively, and therefore slower. The dissemination of plasmid mediated colistin resistance would decrease the effectiveness of colistin in infection treatments. Due to the fact that this antibiotic is used as a last resort, it would mean a void in therapeutic options. Since *mcr-1* was identified, this gene and its variations have been identified in multiple human origin strains, animals and food. Even so, isolates porting the gene in the environment have been scarce, which would suggest *mcr-1* was circulated but confined to the animal and human scopes. In this doctoral thesis we identify an ample number of enterobacteria which proceed from residual waters, previous to treatment, obtained from two different water treatment plants in Barcelona. The phylogenetic analysis of these revealed the existence of two predominant *E. coli* clones, which came from both treatment plants, demonstrating the circulation of the both clones among the healthy population. Also, the presence of *mcr-1* in bacteria belonging to water treatment plants, implies the direct release of these clones into the environment. Surprisingly, one of the *mcr-1* porting isolates, did not display the resistance phenotype to colistin. Even so, its transformation did display the resistance phenotype, once more demonstrating the gene silencing phenomenon, which makes detection difficult and favours dissemination.

As a conclusion, this thesis allows to achieve a better knowledge about the evolution and propagation pathways of resistance mechanisms, relevant to public health. This knowledge could be used to adopt control measures helping to slow down the progression of antimicrobial

resistance, and predict the emergence of new resistance mechanisms and their dissemination paths.

Penicillin
Golden Drug of the Battlefield
...Blessing for Mankind



"All I remember of the hospital stay was the always uncomfortable wire net. Really bad. There is another I hope like a baby. But, later I was told the doctors thought the only long chance of saving my legs. I was flown to hospital. That was nine weeks ago. There are weeks of Painswick treatment left to do, as you can see. But that's not all. Three weeks of treatment also get me a Mission. The resident doctor came in the South. I



What is PENICILLIN?

Psyllidin is a precision powder extracted from green mold, similar in appearance to the mold you have seen on stale bread. It is harmful from the mold like golden drops of dew. These drops are reduced to powder here for shipping to health care hospitals where, like penicillin, it is dissolved in distilled water before being injected.

To our wounded fighting men who are beset by frightful infections, this golden drug means hope and happiness. For Penicillin is a heavyweight champion in the battle against infection. For example, in some cases, Penicillin is almost 100 times as effective as the sulfa drugs.

Injected, Penicillin acts wonderfully for the area where the infection is deepest. And almost invariably, the infection is wiped out. Like Salts, Penicillin is not a cure-all, however. But, it has cleared infected wounds when everything else failed. It has, moreover, granted countless recuperations. Penicillin now lies...and perhaps even before this War ends, this battle-front community will have become a blessing for all mankind.

Another Brilliant Medical Triumph

[illegible]

A SALUTE FROM BAYER ASPIRIN
TO THE HEROIC PERSONNEL OF THE
MEDICAL DEPARTMENTS OF
THE UNITED STATES ARMED FORCES

INTRODUCCIÓN

Imagen: Artículo del periódico *The Courier* de Louisville, Kentucky, EE.UU. 14 de Mayo de 1944.

INTRODUCCIÓN

I. ANTIBIÓTICOS, RESISTENCIAS Y CONCEPTO *ONE HEALTH*

Inicialmente el término antibiótico fue utilizado para denominar a aquellas sustancias de origen natural o semisintético, producidas por microorganismos o procedentes de la modificación química de los mismos, capaces de inhibir el crecimiento o incluso destruir bacterias y otros microorganismos (White RJ, 2012; Mohr KI, 2016). Sin embargo, hoy en día este término se ha extendido para referirse a sustancias naturales, semisintéticas o exclusivamente sintéticas, producidas a través de procesos de síntesis química en laboratorios, con actividad antibacteriana que no resulten extremadamente tóxicas para el hospedador (White RJ, 2012).

El descubrimiento de los antibióticos revolucionó el mundo mejorando el tratamiento de las enfermedades infecciosas y transformando lo que hasta entonces eran enfermedades mortales (en Estados Unidos en 1900 el 45% de las muertes eran debidas a enfermedades infecciosas) en problemas de salud tratables (Mohr KI, 2016; Dodds DR, 2016). Este hecho supuso un antes y un después en la medicina, por lo que a la época previa al uso de los antibióticos se la conoce como era pre-antibiótica (Mohr KI, 2016). Gracias a la capacidad de los antibióticos de controlar las enfermedades infecciosas, la medicina y cirugía han conseguido desarrollarse hasta alcanzar grandes logros como la capacidad de realizar operaciones quirúrgicas complicadas (trasplantes, cirugías cardíacas, etc.) y tratamientos quimioterápicos; también ha mejorado y prolongado la calidad de vida de individuos inmunosuprimidos y/o con enfermedades crónicas (diabéticos, artritis reumatoide, enfermos de SIDA, etc.) (Ventola CL, 2015). Todo ello ha promovido el aumento de la esperanza de vida, que al principio del siglo XX se situaba en torno a unos 56 años y que actualmente se sitúa alrededor de los 80 años (Ventola CL, 2015).

El uso de antibióticos en medicina veterinaria se inició paralelamente al uso en medicina humana (Economou V *et al.*, 2015). Su utilización en animales de producción no solo estuvo orientada al tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas, sino también a su uso como promotores del crecimiento, en donde pequeñas cantidades de antibióticos a dosis

subterapéuticas producían un aumento en la ganancia de peso (Economou V *et al.*, 2015). Su uso como promotores de crecimiento está desde 2006 prohibido en la Unión Europea, pero sigue siendo aceptado en otros países como Estados Unidos (Economou V *et al.*, 2015). El tipo de antibióticos que pueden utilizarse está regulado y limitado a unos pocos, sin embargo, el consumo de los mismos está en aumento (Economou V *et al.*, 2015).

Después de la introducción de los antibióticos en la práctica clínica se pensaba que las infecciones serían historia, por lo que se descuidó su pauta de administración, empleándose de forma masiva tanto en medicina humana como veterinaria (Dijkmans AC *et al.*, 2015). Sin embargo, de manera casi simultánea a su descubrimiento, se observó que las bacterias eran capaces de desarrollar mecanismos que las hacían resistentes a los antibióticos (Ventola CL, 2015). En general, la mayoría de los genes que codifican esos mecanismos de resistencia están presentes de forma natural en la naturaleza, por lo que el uso de los antibióticos conduce inevitablemente a la aparición de resistencias (Collignon P, 2013). De tal manera que cuando se lanzaba al mercado un nuevo antibiótico pasaba poco tiempo hasta que se detectaban los primeros aislados resistentes (figura 1) (Mohr KI, 2016). Sin embargo, pese a que la resistencia antimicrobiana es un proceso evolutivo natural, el abuso e incorrecta utilización de los antibióticos en medicina humana, veterinaria y en agricultura, ha favorecido y acelerado de manera drástica el desarrollo, selección y la evolución de la resistencia (Collignon P, 2013; Ventola CL, 2015).

La rápida emergencia y diseminación de los mecanismos de resistencia antimicrobiana junto con la baja disponibilidad de nuevos antibióticos, ha cambiado completamente la situación de la medicina actual, retornándonos a la época donde la mortalidad por enfermedades infecciosas era elevada (Ventola CL, 2015; Dodds DR, 2016). Este aumento de la mortalidad junto con el incremento de los costes médicos convierte a la resistencia a los antibióticos en una de

las mayores amenazas para la Salud Pública a nivel mundial, pues pone en peligro todos los avances conseguidos por la medicina moderna (Ventola CL, 2015).

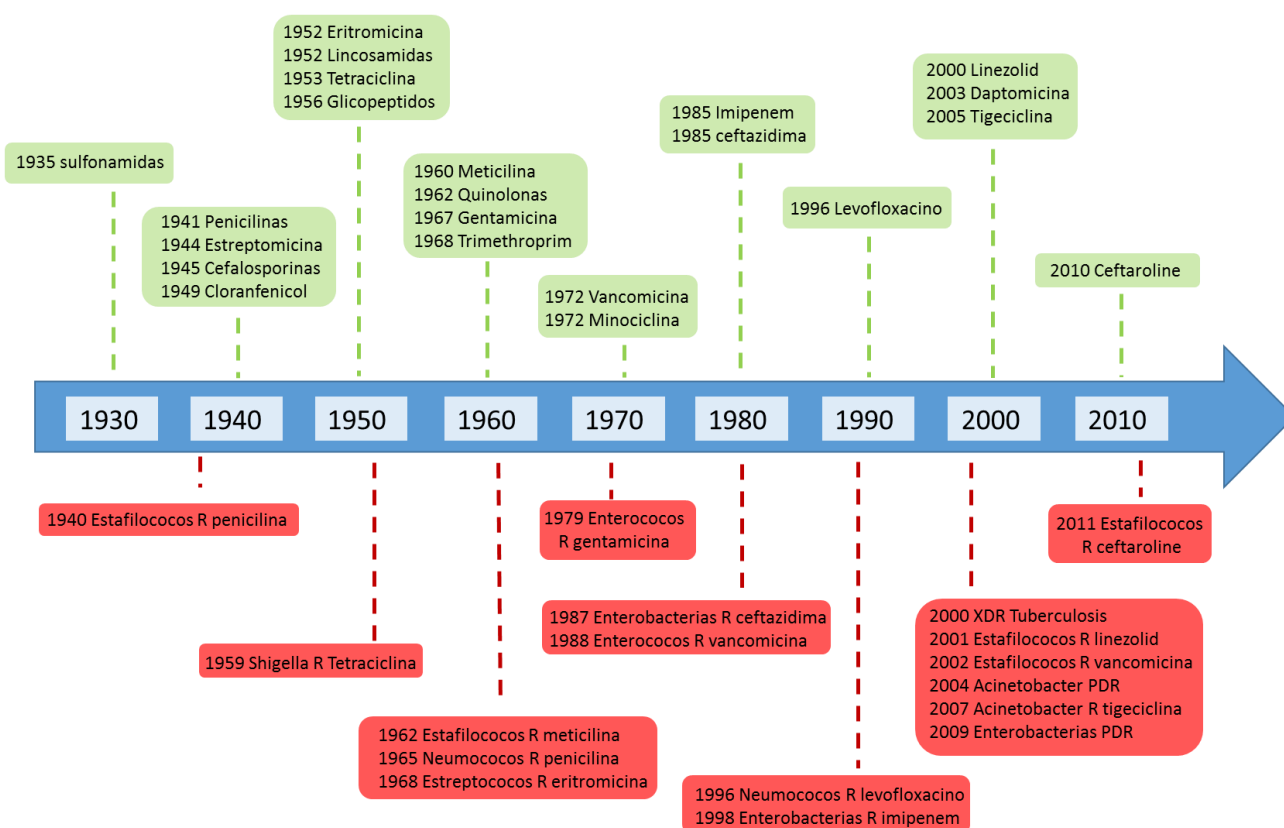


Figura 1. Cronograma comparativo de la comercialización de los antibióticos y la aparición de resistencias. En verde se encuadran los antibióticos y el año de comercialización. En rojo se encuadra el año de identificación de la resistencia frente a un antibiótico en concreto y el microorganismo donde se identificó. XDR: extensamente resistentes. PDR: pan-resistentes. R: resistentes (CDC, 2013; Grossman TH, 2016; Conly J *et al.*, 2005; Peleg AY *et al.*, 2007).

El resistoma bacteriano está formado por todos los elementos genómicos presentes en una bacteria que codifican la resistencia antimicrobiana, pudiéndose encontrar tanto expresados como silenciados (Piffaretti JC, 2016). Estos elementos son potencialmente transferibles de unas bacterias a otras a través de elementos genéticos móviles como por ejemplo plásmidos (Piffaretti JC, 2016). Esta transferencia puede darse entre bacterias de la misma y de distintas especies, entre bacterias patógenas, comensales y oportunistas, de animales, humanos o que se encuentren presentes en el medio ambiente. Así mismo, las bacterias resistentes son capaces de transmitirse entre humanos, animales y el medio ambiente (Collignon P, 2013). Por lo tanto, para poder frenar el avance de la resistencia antimicrobiana es necesario que la abordemos en su totalidad a través del concepto de One Health, por el cual se reconocen las interconexiones directas e indirectas que existen entre los sectores humano-

animal-medioambiental, y se solicita la colaboración e interacción entre los expertos de los tres campos para abordar el problema de la resistencia (Piffaretti JC, 2016; Collignon P, 2013).

II. TETRACICLINAS

2.1 Origen

A parte del grupo liderado por Selman Waksman, a principios de 1940 había pocos expertos en la búsqueda de microorganismos del suelo capaces de sintetizar sustancias antimicrobianas. La compañía farmacéutica Lederle creó un grupo liderado por Benjamin Minge Duggar que en 1945 identificó el que sería el primer miembro de la familia de las tetraciclinas, la clortetraciclina, procedente de un cultivo de *Streptomyces aureofaciens* (Bradford P. A *et al.*, 2012; Nelson ML, 2001). Poco tiempo después otra compañía farmacéutica, Pfizer, identificó un compuesto estructuralmente relacionado con la clortetraciclina que presentaba menos efectos secundarios y una mayor actividad, la oxitetraciclina (1948), producida por *Streptomyces rimosus*. Más adelante Pfizer modificó la estructura de la clortetraciclina para generar un nuevo compuesto más potente que los dos anteriores, la tetraciclina (1953). Gracias a su estructura más simple la tetraciclina se convirtió en la estructura genérica del grupo, otorgándole el nombre a la familia y, aunque en su origen fue semisintética, posteriormente se encontró la forma de producirla de forma natural mediante fermentación. A partir de entonces se descubrieron y sintetizaron múltiples compuestos como la demetilclortetraciclina, la doxiciclina, la minociclina, la rolitetraciclina, la limeciclina o la clomociclina (figura 2) (Bradford P. A *et al.*, 2012; Nelson ML *et al.*, 2011; Chopra I *et al.*, 2001 A).

Después de un periodo de pausa en la investigación por sintetizar nuevas tetraciclinas se reinició el programa de investigación con el fin de obtener nuevas tetraciclinas activas contra patógenos que portaran elementos de resistencia contra las tetraciclinas ya comercializadas y consiguieran restaurar la utilidad de estos antibióticos. La adición de una molécula de glicil amido en la estructura de la minociclina dio lugar a la tercera generación de tetraciclinas, las glicilciclinas, cuyo representante principal es la tigeciclina (Bradford PA *et al.*, 2012).

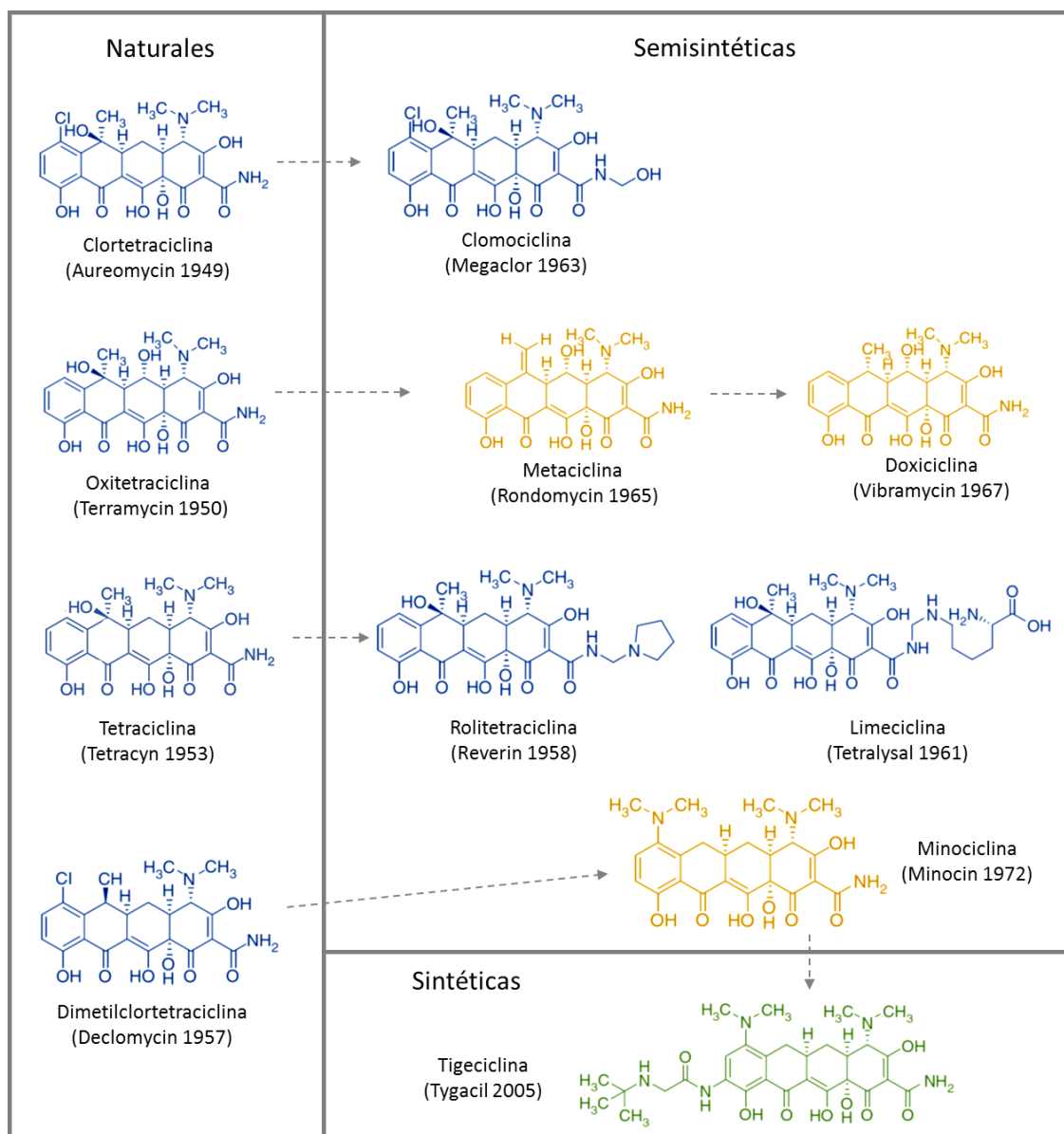


Figura 2. Principales miembros de uso clínico de la familia de las tetraciclinas. En color azul están representados los antibióticos pertenecientes a la primera generación de tetraciclinas, en color amarillo los de la segunda generación y en color verde el de la tercera generación de tetraciclinas. Entre paréntesis se encuentra el nombre comercial y el año de comercialización (Nelson ML, 2001; Chopra I *et al.*, 2001 A; Grossman TH, 2016).

2.2 Estructura química

Las tetraciclinas presentan un núcleo formado por 4 anillos lineales tetracíclicos fusionados, comúnmente llamados como A, B, C y D (figura 3). Cada uno de los anillos presenta distintos grupos funcionales en distintas posiciones, dando lugar a los distintos compuestos de la familia (determinarán el tipo de tetraciclina y su función). Los elementos esenciales para la actividad antibacteriana de la molécula son tanto la disposición lineal de los anillos fusionados

como la presencia del grupo dimetilamino en posición 4 (Chopra I *et al.*, 2001 A). La molécula puede dividirse en dos zonas. La zona inferior se corresponde con la zona no modificable de la molécula, ya que es la parte que interactúa con la subunidad 30S del ARNr. Por el contrario, la parte superior de la molécula sí que admite variaciones, de tal manera que el intercambio de grupos funcionales en esta zona puede mejorar o empeorar las características de la molécula como antimicrobiano (Domenico F, 2012).

Las tetraciclinas son agentes quelantes que requieren de esta capacidad para ejercer su función, como veremos más adelante. Los sitios de quelación se sitúan en las posiciones 1, 2, 3, 11, 12 de la estructura (Chopra I *et al.*, 2001 A). La introducción de un grupo acilamido en la posición 9 del anillo tetracíclico D dio lugar a las gliciliclinas (Chopra I *et al.*, 2001 B). Hoy en día se está trabajando en la modificación de la molécula en esta posición junto con la posición 8 con el fin de encontrar nuevas moléculas con actividad antimicrobiana altamente específica (Domenico F, 2012). Actualmente, la omadaciclina, el primer miembro perteneciente a un nuevo tipo de moléculas, se encuentra en fase 3 de ensayos clínicos (Waites KB *et al.*, 2016; Sun H *et al.*, 2016).

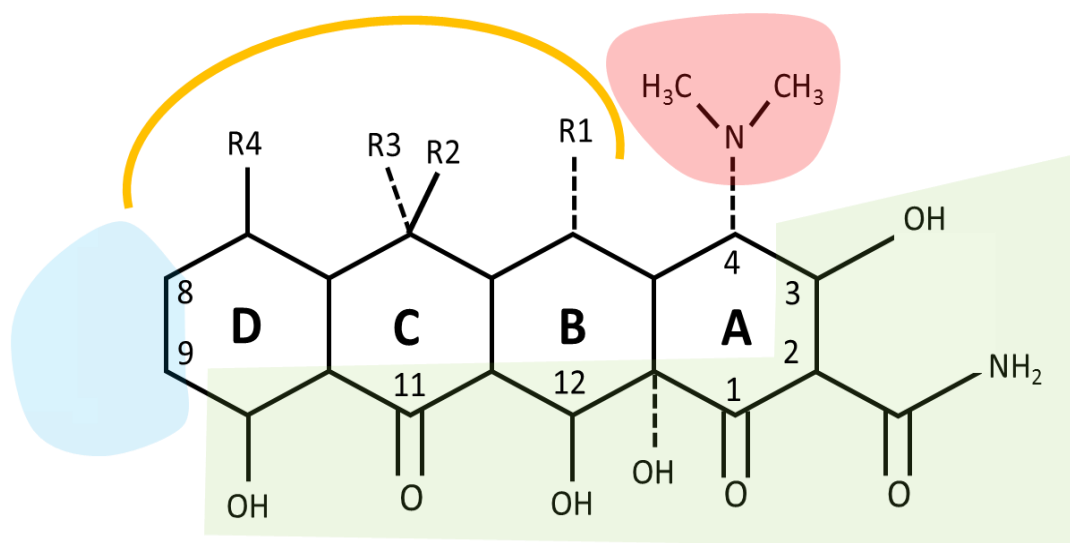


Figura 3. Estructura química común de las tetraciclinas. Se representa el núcleo tetracíclico con los distintos radicales. En sombreado rojo se destaca el grupo dimetilamino, esencial para la actividad antibacteriana de la molécula. Bajo el arco naranja se encuentra la zona susceptible a modificaciones para la mejora de las características antimicrobianas de la molécula. La zona sombreada en verde incluye la parte de la molécula que contactará con la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. La zona coloreada en azul se corresponde con la zona susceptible de modificaciones para la tercera generación de tetraciclinas (adaptación de Domenico F, 2012).

2.3 Mecanismo de acción

Las tetraciclinas forman parte del grupo de antibióticos que inhiben la síntesis proteica junto con los aminoglucósidos, rifampicina, macrólidos, linezolid, nitrofuranos, clindamicina, cloranfenicol, estreptograminas y el ácido fusídico (tabla 1) (Hauser AR, 2013).

Tabla 1. Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas. (Hoang P *et al.*, 2016; Hauser AR, 2013)

| Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas | | |
|---|-------------------------------------|--|
| Afecta a la transcripción | Inhibe la ARN polimerasa | Rifampicina |
| Afecta a la traducción | Afecta a la subunidad 30S ribosomal | Aminoglucósidos Tetraciclinas |
| | Afecta a la subunidad 50S ribosomal | Cloranfenicol Macrólidos Clindamicina Ácido fusídico Estreptograminas Linezolid |
| | Alteración de proteínas ribosomales | Nitrofurantoína |

En particular, las tetraciclinas inhiben la síntesis proteica mediante su unión reversible e interacción con la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, de tal manera que bloquea estéricamente el acoplamiento del aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma durante la elongación de la proteína, impidiendo que se incorporen aminoácidos a la cadena peptídica (Grossman TH, 2016). Las tetraciclinas presentan múltiples lugares de interacción en la subunidad 30s ribosomal. Los principales lugares de unión se localizan en el ARN ribosomal 16S (ARNr) y son las hélices 34 y el tallo de la hélice 31, situadas próximas a la región sitio A en donde se colocará el aminoacil-ARNt (Cate JH *et al.*, 1999). El segundo lugar de unión de las tetraciclinas se encuentra en el bolsillo hidrofóbico de la proteína ribosomal S4 (Pioletti M *et al.*, 2001).

Como consecuencia de esta inhibición no solo se ve afectada la producción de proteínas, sino que otras macromoléculas como por ejemplo el ADN o ARN pueden verse alteradas, así como la síntesis de la pared celular, la membrana plasmática, la morfología celular o la captación de precursores de ADN o ARN, entre otros efectos (Nelson *et al.* 2011).

Para que las tetraciclinas lleguen a ejercer su acción deben alcanzar la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, por lo que deben penetrar en el citoplasma de la bacteria y ser capaces de unirse al ribosoma. Para llegar hasta el citoplasma las tetraciclinas deberán atravesar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y la membrana citoplasmática en el caso tanto de las bacterias Gram-negativas como de las Gram-positivas. Las tetraciclinas difunden pasivamente a través de proteínas de membrana externa, porinas OmpC y OmpF. Para ello, la tetraciclina debe formar un complejo quelante con un ión metálico catiónico, generalmente el magnesio. El complejo cargado positivamente es capaz de atravesar la membrana externa atraído por las fuerzas de Donnan y acumularse en el espacio periplásmico. Posteriormente, se disocia del catión y atraviesa la membrana citoplasmática en un proceso dependiente de energía, gracias a la fuerza protón-motriz y la hidrólisis de uniones fosfato. Una vez en el citoplasma, la tetraciclina debe volver a quelarse para unirse al ribosoma. (Grossman TH, 2016; Chopra I *et al.*, 2001 A)

2.4 Clasificación, propiedades y efectos adversos

La tetraciclinas se clasifican en tres generaciones atendiendo al orden de descubrimiento, propiedades farmacocinéticas y actividad antimicrobiana (figura 2) (Vicente D *et al.*, 2010).

Las tetraciclinas de primera generación son las más antiguas. Presentan una peor absorción oral, son menos lipofílicas, por lo que penetran pobremente en los tejidos, y no se metabolizan en el organismo, a excepción de la tetraciclina (5% excretada como metabolito). Presentan una vida media que varía de entre 6 a 17 horas y son eliminadas tanto por vía renal como fecal a través de la bilis (Vojtová V *et al.*, 2009; Agwuh KN *et al.* 2006; Curcio DJ *et al.*, 2006; Vicente D *et al.*, 2010). En general, se administran por vía oral, pudiéndose también administrar algunas de ellas por vía parenteral (oxytetraciclina, tetraciclina) excepto la rolitetraciclina, que exclusivamente se administra por vía parenteral (Hauser AR, 2013; Agwuh KN *et al.* 2006).

Las de segunda generación presentan una mayor absorción, casi por completo, en estómago y primera parte del intestino delgado. Son más lipofílicas, lo que mejora su penetración tisular (Vicente D *et al.*, 2010). La doxiciclina no se metaboliza pero la minociclina da lugar a un mayor número de metabolitos, algunos de ellos con actividad antimicrobiana. Presentan una mayor vida media que las de la primera generación, con valores en torno a las 13-21 horas dependiendo del tipo de dosis y administración. Se pueden administrar tanto por vía oral como por vía parenteral. Se eliminan mayoritariamente por heces aunque también por orina (Vicente D, *et al.*, 2010; Vojtová V *et al.*, 2009; Agwuh KN *et al.* 2006; Curcio DJ *et al.*, 2006).

La tigeciclina, único miembro de la tercera generación, presenta baja biodisponibilidad por vía oral, por lo que su administración es exclusivamente por vía intravenosa y, al ser altamente lipofílica, su volumen de distribución tisular es muy amplio, alcanzando altas concentraciones en distintos tejidos (pulmón, hígado, corazón, piel, meninges, hueso) y en fluidos corporales. Por el contrario, su concentración plasmática es baja. Tiene una altísima vida media, sobre todo al administrarse en dosis múltiples, pudiendo alcanzar 66 horas. Alrededor del 20% es metabolizado en el hígado antes de excretarse. Se elimina principalmente por vía biliar-fecal y, de manera secundaria, por vía renal (Curcio DJ *et al.*, 2006; Peterson LR, 2008; Vojtová V *et al.*, 2009; Agwuh KN *et al.* 2006).

La interacción de las tetraciclinas con el ribosoma de las células eucariotas es prácticamente nula, razón por la cual se les atribuye propiedades antimicrobianas selectivas con limitados efectos secundarios (Chopra I *et al.*, 2001 A; Roberts MC, 2003; Domenico F, 2012). Los más característicos y comunes para las tres generaciones de tetraciclinas son dos: la deposición en el tejido óseo y dental, acompañado de una decoloración de los mismos como consecuencia de la quelación de calcio, y la alteración de los queratinocitos y fibroblastos del tejido ocular, que conduce a la fotosensibilidad (Domenico F, 2012).

2.5 Uso

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos que exhiben actividad contra un amplio espectro de microorganismos patógenos tanto Gram-positivos como Gram-negativos, bacterias anaerobias, espiroquetas, bacterias atípicas e incluso protozoos (Chopra I *et al.*, 1992; Maaland MG *et al.* 2013; Hauser AR, 2013; Roberts MC, 2003; Domenico F, 2012; Nelson ML *et al.*, 2011). Son unos de los antibióticos más baratos, con menor toxicidad y con una buena absorción, lo cual ha facilitado su uso en medicina humana, veterinaria y agricultura, inclusive

en países en desarrollo (Roberts MC, 2003; Michalova E *et al.*, 2004; Domenico F, 2012). No obstante, es cierto que hoy en día su uso está condicionado y limitado por la alta prevalencia de resistencia a las mismas (Nelson ML *et al.*, 2011).

2.5.1 Medicina humana

Como consecuencia de la continua aparición de resistencias, el uso de tetraciclinas en medicina humana cada vez es más reducido en comparación con otros antibióticos como las penicilinas, cefalosporinas o quinolonas (ECDC, 2015 B). Sin embargo, se siguen prescribiendo como agentes profiláxicos y en el tratamiento de infecciones de la comunidad tanto bacterianas como no bacterianas, entre las que se destaca el tratamiento de brucelosis, cólera, paludismo, infecciones de transmisión sexual, gastritis asociadas a *Helicobacter pylori*, tratamiento del ántrax, y de infecciones del tracto respiratorio bajo (Roberts MC, 2003; Vicente D *et al.*, 2010).

Aunque inicialmente las tetraciclinas fueron concebidas para su uso como antibióticos, cada vez más se está estudiando su uso como sustancias no antibióticas para diversos fines, como antiinflamatorios, antivirales, anticancerígenos, para el tratamiento de alteraciones neurológicas, inmunosupresivos y anticolagénicos (por lo que son utilizados a concentraciones subterapéuticas en el tratamiento del acné y la rosácea) (Perret LJ *et al.*, 2014; Domenico F, 2012; Ermak G *et al.*, 2003).

2.5.2 Medicina veterinaria

Desde hace años las tetraciclinas se han usado en animales y, a raíz de la aparición de resistencias, hoy en día su uso en medicina veterinaria está mucho más extendido que en medicina humana (ECDC, 2015 A). Se emplean tanto en animales de compañía como en animales de producción (Michalova E *et al.*, 2004). En el caso de los animales de producción, las tetraciclinas autorizadas por la Unión Europea para su uso como agentes terapéuticos en animales destinados a la producción de alimentos son la clortetraciclina, oxytetraciclina, tetraciclina, y doxiciclina (Reglamento UE 37/2010; Reglamento UE 2015/151).

2.5.3 Agricultura

La cantidad de antibióticos que se usan en agricultura es muy inferior a la utilizada en medicina humana y animal (McManus PS *et al.*, 2002). Debido al coste que supone un tratamiento antibiótico, este solo se lleva a cabo para el tratamiento de infecciones bacterianas en frutas y hortalizas de alto valor económico y en el tratamiento de plantas ornamentales (Stockwell VO *et al.*, 2012). La oxytetraciclina es la única tetraciclina autorizada para el control

de infecciones en agricultura, principalmente en el tratamiento del Fuego Bacteriano (*Erwinia amylovora*). (McManus PS *et al.*, 2002; Stockwell VO *et al.*, 2012).

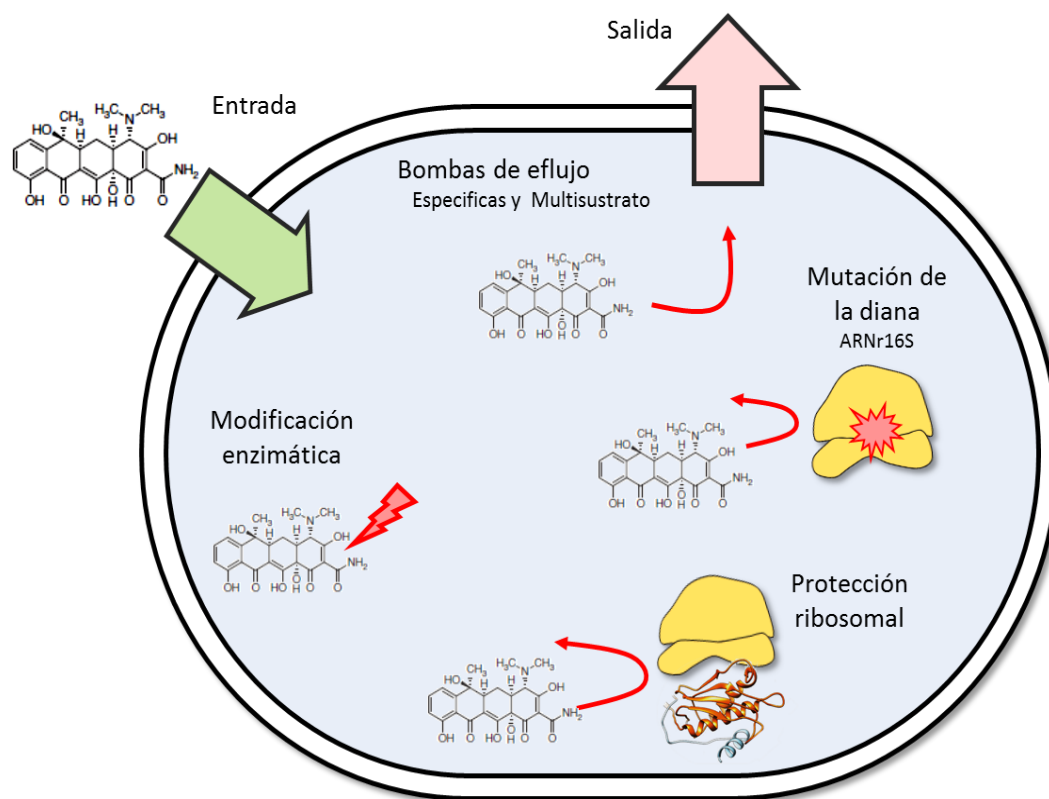


Figura 4. Mecanismos de resistencia a tetraciclinas.

2.6 Mecanismos de resistencia

Existen 4 mecanismos responsables de la resistencia a tetraciclinas (figura 4), siendo las bombas de eflujo específicas y la protección ribosomal los más prevalentes. Los genes específicos de la resistencia a tetraciclina se recogen bajo la nomenclatura de genes *tet* (*tetracycline resistance genes*) y *otr* (*oxytetracycline resistance genes*), ambos genes movilizables (Peterson LR, 2008; Roberts MC, 2003).

2.6.1 Bombas de eflujo específicas

La expulsión de tetraciclinas a través de bombas de eflujo energía dependientes son el mecanismo de resistencia a tetraciclinas más extendido tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas (Chopra I *et al.*, 2001A; Wang W *et al.*, 2014). A través de estas bombas

de eflujo se consigue extruir las tetraciclinas que se encuentra en el citoplasma hacia el exterior de la bacteria, disminuyéndose la concentración intracelular de las tetraciclinas e impidiendo que alcancen el ribosoma y realicen su función (Chopra I *et al.*, 2001A). Las bombas pertenecen principalmente a la superfamilia del facilitador mayor (MFS) aunque también están implicadas bombas de la superfamilia de casete de unión al ATP (ABC) (Lan Yu *et al.*, 2012; Warburton PJ *et al.*, 2013; Reynolds LJ *et al.*, 2016). Los genes que codifican para estas bombas se encuentran generalmente asociados a plásmidos grandes frecuentemente conjugativos, aunque también pueden encontrarse en plásmidos pequeños y en el cromosoma (Michalova E *et al.*, 2004; Chopra I *et al.*, 2001 A). Hasta hace poco, se pensaba que ninguna de estas bombas confería de forma natural resistencia a las glicilciclinas, sin embargo, recientemente se ha descrito la implicación de TetL (familia MFS) y TetAB (familia ABC) en la extrusión de tigeciclina (Linkevicius M *et al.*, 2015; Reynolds LJ *et al.*, 2016; Fiedler S *et al.*, 2016).

2.6.2 Protección ribosomal

La protección del ribosoma es el segundo mecanismo más importante en la resistencia a tetraciclinas, que se puede encontrar tanto en Gram positivas como en Gram-negativas (Michalova E *et al.*, 2004). Confiere resistencia a tetraciclinas de primera y segunda generación a través de la participación de proteínas citoplasmáticas parálogas a factores de elongación, que debilitan la interacción de las tetraciclinas con el ribosoma y liberan el antibiótico, impidiendo que ejerza su función (Chopra I *et al.*, 2001A; Thaker M *et al.*, 2010). Al igual que ocurría con las bombas de eflujo, se consideraba que no eran capaces de proteger el ribosoma frente a la acción de las glicilciclinas, hasta la reciente descripción de la implicación de TetM en la resistencia a tigeciclina en *Enterococcus faecium* (Thaker M *et al.*, 2010; Modificación Chopra I *et al.*, 2001C; Fiedler S *et al.*, 2016).

2.6.3. Otros mecanismos

2.6.3.1 Inactivación enzimática

La resistencia a tetraciclinas a través de la modificación e inactivación enzimática de la molécula es un mecanismo mucho menos diseminado que los dos anteriores, a pesar de que sea un mecanismo más eficiente, ya que solo actuando una vez inutiliza el antibiótico, al contrario que las bombas o la protección ribosomal, que requieren de un continuo funcionamiento para que la bacteria sobreviva a la acción del antibiótico (Forsberg KJ *et al.*, 2015). Los mecanismos que producen la inactivación son diferentes, por ejemplo TetX y Tet(37) son oxidoreductasas

dependientes de NADPH (Speer BS *et al.*, 1991; Diaz-Torres ML *et al.*, 2003) mientras que Tet(34) es una xantina-guanina-fosforribosil transferasa (Nonaka L *et al.*, 2002; Forsberg KJ *et al.*, 2015).

2.6.3.2 Mecanismos de resistencia inespecíficos

Además de los mecanismos específicos de resistencia a tetraciclinas codificados por genes *tet* y *otr*, existen otros mecanismos que confieren multirresistencia que también engloban a las tetraciclinas (Michalova E *et al.*, 2004). Estos mecanismos son: I) mutaciones en la región conservada de la hélice 34 del ARN ribosomal 16S, que se corresponde con el sitio de unión primario de las tetraciclinas al ribosoma (Nonaka L *et al.*, 2005). II) Sobreexpresión de bombas de eflujo multisustrato capaces de captar nutrientes y excretar distintos tipos de compuestos, como productos del metabolismo y sustancias tóxicas como los antibióticos, entre los que pueden estar las tetraciclinas (Li XZ *et al.*, 2004). Como ejemplos de bombas de eflujo multisustrato más relevantes clínicamente implicadas en la resistencia a tetraciclinas podemos destacar las bombas tipo Ade de *Acinetobacter*, las tipo Mex características de *Pseudomonas* y la bomba AcrAB de bacterias Gram-negativas, que tendrán una importancia significativa en la resistencia a tigeciclina, como veremos más adelante (Li XZ *et al.*, 2009).

2.7 Tigeciclina, la nueva tetraciclina

Tras el inicio de la utilización de las tetraciclinas en el tratamiento de enfermedades infecciosas empezaron a aparecer bacterias resistentes, lo que provocaba fallos terapéuticos tras la administración de estos antibióticos, y por ello las tetraciclinas quedaron relegadas a antibióticos de segunda e incluso tercera línea (Petersen PJ *et al.*, 1999). Con el fin de restaurar el poder de las tetraciclinas como antibióticos de amplio espectro se inició la búsqueda de nuevos compuestos activos contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas e incluso bacterias resistentes a tetraciclinas a través de los típicos mecanismos de resistencia (Chopra I, 2002). Fue así como se descubrieron las glicilciclinas, la primera familia de la tercera generación de tetraciclinas, cuyo único miembro de uso clínico es la tigeciclina.

2.7.1 Características específicas

La tigeciclina es un derivado sintético de la minociclina, formado por adición de una cadena lateral 9-tert-butil-glicilamido en el carbono 9 del anillo D de núcleo tetracíclico (Petersen PJ *et al.*, 1999). Este grupo funcional otorga una serie de características beneficiosas que determinarán la mejora de la actividad biológica de la tigeciclina frente al resto de tetraciclinas: I) incrementa su liposolubilidad, lo que se refleja en un aumento de la distribución

del fármaco; II) incrementa la afinidad con la que se une al ribosoma, lo que aumenta su actividad hasta en 5 veces con respecto al resto de tetraciclinas; III) cambia la orientación con la que se une al ribosoma que junto con el aumento de afinidad, la hace más resistente a los mecanismos de protección ribosomal; IV) impide la extrusión celular a través de las bombas de eflujo específicas, bien por la incapacidad de las bombas de reconocer la tigeciclina como sustrato o bien por la imposibilidad de transferir la tigeciclina a través de la membrana citoplasmática, a pesar de que la hayan reconocido y anclado (Seputiene V *et al.*, 2010; Petersen PJ *et al.*, 1999; Chopra I, 2002). Esto determina que la tigeciclina sea capaz de vencer los dos mecanismos de resistencia principales a las tetraciclinas.

2.7.2 Aplicaciones terapéuticas

Como cualquier otra tetraciclina, la tigeciclina muestra actividad bacteriostática frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, bacterias atípicas y microorganismos anaerobios. Su singularidad, gracias a las ventajas que le aporta su estructura química, reside en su efectividad *in vitro* contra multitud de bacterias multirresistentes y en su actividad bactericida frente a *Legionella*, *Streptococcus*, *Escherichia* y *Klebsiella* (Tessier PR *et al.* 2013; Kaewpoowat Q *et al.*, 2015; Peterson LR, 2008; Seputiene V *et al.*, 2010; FDA, 2016). Sin embargo, como consecuencia de la baja concentración en sangre que se consigue durante su aplicación, en los últimos años su uso en el tratamiento de ciertos tipos de infecciones se ha asociado con aumentos de mortalidad (Prasad P *et al.*, 2012).

Con el fin de impedir los fracasos terapéuticos y retrasar la aparición de resistencias, la utilización de la tigeciclina se reserva para el tratamiento hospitalario de infecciones complicadas en piel y anexos (infecciones de heridas, celulitis, abscesos mayores, úlceras infectadas, quemaduras... a excepción de infecciones de heridas en pies de personas diabéticas), infecciones intrabdominales complicadas (apendicitis, colecistitis, diverticulitis, perforaciones, abscesos...), neumonía adquirida en la comunidad, e infecciones provocadas por microorganismos resistentes como SARM, SPRP, ERV o BLEE (Seputiene V *et al.*, 2010; FDA, 2016). Por todo ello, la tigeciclina se utiliza como antibiótico de último recurso cuando es la única alternativa terapéutica posible en ciertas infecciones (Seputiene V *et al.*, 2010; Osei Sekyere J, 2016).

Recientemente se ha empezado a explorar el uso de la tigeciclina como agente quimioterápico. Aunque por el momento solo se han realizado ensayos clínicos preliminares, se han obtenido resultados prometedores debido a la selectividad de acción que muestra en la destrucción de células cancerígenas de ciertos tipos de tumores (Zhijie Xu *et al.*, 2016).

2.7.3. Mecanismos de resistencia

Desde que se identificó el primer caso de resistencia a tigeciclina en 2007, los casos han ido incrementándose principalmente entre bacterias Gram negativas (Sun Y *et al.*, 2013). La resistencia a tigeciclina ha sido descrita más frecuentemente en *Acinetobacter* spp., seguida de cerca por *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* (Sun Y *et al.*, 2013; Fiedler S *et al.*, 2016). La aparición de cepas resistentes a tigeciclina suele ocurrir después del tratamiento con este antibiótico, aunque también se ha descrito la aparición de resistencia a tigeciclina después de un tratamiento antibiótico diferente (Sun Y *et al.*, 2013; Hornsey M *et al.*, 2010). El principal mecanismo de resistencia a tigeciclina tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas son las bombas de eflujo multisustrato. Sin embargo, también se han identificado otros mecanismos de resistencia no relacionados con la extrusión del antibiótico, como la modificación del antibiótico mediada por la enzima TetX o mutaciones en la proteína ribosomal RpsJ (Leski TA *et al.*, 2013; Villa L *et al.*, 2014).

2.7.3.1 Resistencia mediada por bombas de eflujo multisustrato

El principal mecanismo de resistencia a tigeciclina se basa en su extrusión al exterior celular mediante bombas de eflujo. Como se mencionó anteriormente, la tigeciclina es la única tetraciclina que no es reconocida por las bombas específicas de tetraciclinas Tet, con excepción de TetL y TetAB (Fiedler S *et al.*, 2016; Reynolds LJ *et al.*, 2016). Consecuentemente, su extrusión al exterior celular se consigue a través de su reconocimiento por parte de las bombas de eflujo multisustrato (Li XZ *et al.*, 2015).

Basándonos en la clasificación filogenética establecida por Milton Saier, las bombas de eflujo multisustrato se agrupan en cinco superfamilias denominadas por sus siglas en inglés: I) RND, *resistance-nodulation-division superfamily*, II) MFS, *major facilitator superfamily*, III) MATE, *multidrug and toxic compound extrusion*, IV) SMR, *small multidrug resistance*, y V) ABC, *ATP-binding cassette* (Li XZ *et al.*, 2009). En Gram negativos las bombas que tienen mayor relevancia en la resistencia tanto intrínseca como adquirida frente a múltiples antimicrobianos de importancia clínica son las pertenecientes a la familia RND, e igualmente son las bombas de esta familia las que están relacionadas con la resistencia a tigeciclina (Li XZ *et al.*, 2015). Por el contrario, en Gram positivos la resistencia a tigeciclina se asocia a la sobreexpresión de MepA perteneciente a la familia MATE (figura 5) (Cattoir V *et al.*, 2015).

Desde el punto de vista estructural, las bombas de eflujo de la familia RND se caracterizan por ser un sistema tripartito formado por el transportador RND que se encuentra anclado a la membrana interna, y que está asociado con unas proteínas periplásmicas adaptadoras

pertenecientes a la familia de proteínas de fusión de membranas (MFP) y con un canal proteico de membrana exterior (OMP) (figura 5) (Nikaido H, 2011). Son anti-transportadores protón-sustrato, esto quiere decir que utilizan como fuente de energía para su funcionamiento la energía procedente del flujo de protones (Nikaido H, 2011). Los genes que codifican esta estructura tripartita se encuentran generalmente codificados en el cromosoma, y ocasionalmente se han identificado también en plásmidos transferibles (Li XZ *et al.*, 2009). Presentan una selectividad de extrusión altamente promiscua, pudiendo reconocer y extruir al exterior celular una gran variedad de sustancias antimicrobianas, no solo antibióticos, sino también detergentes, biocidas, etc. (Nikaido H *et al.*, 2013).

Se han identificado numerosas bombas de eflujo RND relacionadas con la resistencia a tigeciclina, asociadas a diversas especies bacterianas (Li XZ *et al.*, 2015). En enterobacterias, la resistencia a tigeciclina se relaciona con las bombas de eflujo AcrAB, AcrEF, OqxAB o KpgABC. En *Acinetobacter* spp., con AdeABC, AdeIJK y AdeFGH. MexAB y MexXY son las responsables de la extrusión de tigeciclina en *Pseudomonas* spp., y SmeDEF (*Stenotrophomonas maltophilia*), CeoAB (*Burkholderia* spp.) o SdeXY (*Serratia marcescens*) también se relacionan con la resistencia a tigeciclina (Li XZ *et al.*, 2015).

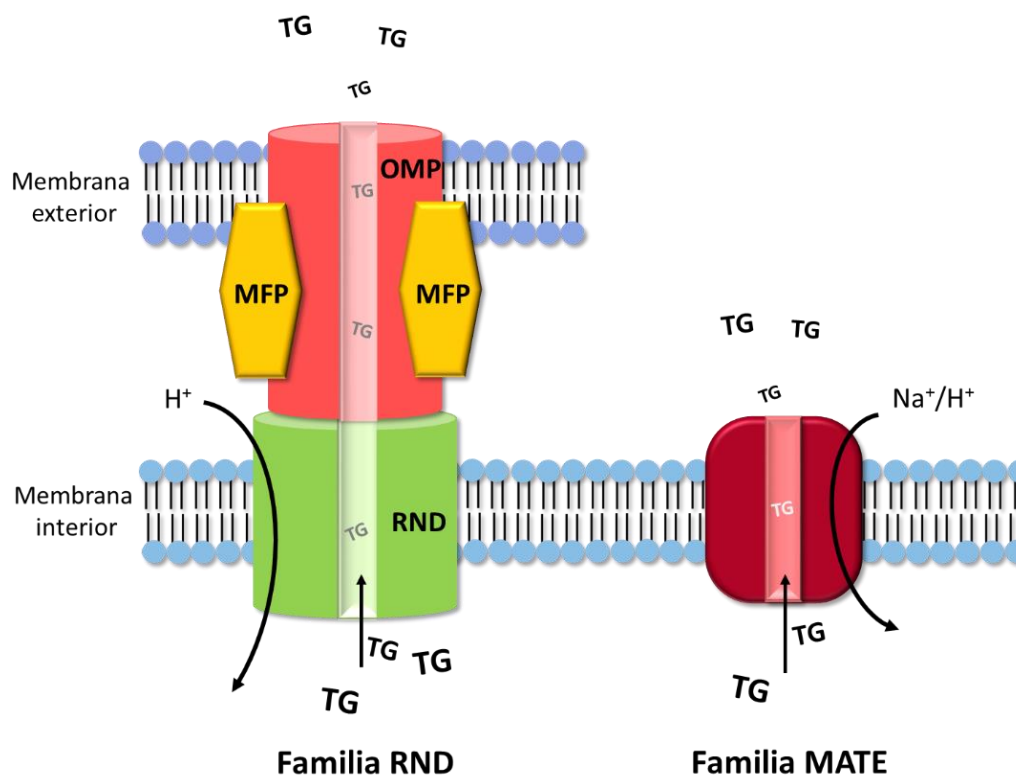


Figura 5. Estructura de las familias de bombas de eflujo multisustrato implicadas en la resistencia a tigeciclina. RND en bacterias Gram negativas y MATE en bacterias Gram positivas. TG: tigeciclina. MFP: proteínas de fusión de membrana. OMP: canal proteico de membrana exterior.

Centrándonos en enterobacterias, AcrAB es la principal responsable de la resistencia a tigeciclina. Los genes que codifican la estructura tripartita son para la proteína de fusión de membrana AcrA, el transportador RND AcrB y el canal de membrana exterior TolC. Los genes que codifican AcrA y AcrB se encuentran en el cromosoma formando el operón *acrAB*, mientras que el gen que codifica TolC se sitúa también en el cromosoma pero alejado del operón *acrAB*, y además no es exclusivo de AcrAB, sino que se asocia con otros transportadores RND para formar otras bombas (Li XZ *et al.*, 2004).

Para que AcrAB-TolC produzca un fenotipo de multirresistencia debe estar sobreexpresada mediante mutaciones en sus genes reguladores que consigan una sobreexpresión de sus activadores o una inactivación de los represores (Li XZ *et al.*, 2015). Este control se realiza a dos niveles, local y global. De la regulación local se encarga el gen *acrR* transcrito divergentemente al operón *acrAB*. Sin embargo, la regulación de los niveles de expresión de la bomba AcrAB-TolC son predominantemente controlados por los reguladores globales, entre los que se encuentran AcrS, SdiA, MarA, SoxS, Rob, PhoQP y EvgAS (Li XZ *et al.*, 2015).

Con respecto al resto de bombas de eflujo implicadas en la resistencia a tigeciclina en enterobacterias, AcrEF es también una bomba cromosómica con una alta homología a AcrAB, que también requiere de TolC como canal de membrana exterior y cuya sobreexpresión está causada por una alteración en su regulación, como ocurría con AcrAB (Li XZ *et al.*, 2004; Olliver A *et al.*, 2005). OqxAB es una bomba codificada tanto en plásmidos como en el cromosoma, que principalmente extruye fluoroquinolonas y que recientemente se ha asociado a la resistencia a tigeciclina, encontrándose sobreexpresada junto con AcrAB (Ho PL *et al.*, 2015; Zhong X *et al.*, 2014). Su sobreexpresión de nuevo se relaciona con mutaciones en sus reguladores (Bialek-Davenet S *et al.*, 2015). Por el contrario, la bomba cromosómica KpgABC ha sido recientemente descrita como responsable de la resistencia a tigeciclina mediante la inserción en la zona aguas arriba de su operón de la secuencia de inserción IS5, que afecta a la transcripción tanto de *kpgA* como *kpgB* pero no de sus reguladores (Nielsen LE *et al.*, 2014). En este caso, la sobreexpresión de esta bomba no se ha visto relacionada con la sobreexpresión de OqxAB o AcrAB (Nielsen LE *et al.*, 2014).

III. AMINOGLUCÓSIDOS

3.1 Descubrimiento y desarrollo

Después del descubrimiento de la penicilina atribuido a Alexander Fleming en 1928, surgió la necesidad de buscar nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas. Al principio de la década de 1940, se formaron distintos grupos de investigación centrados en la identificación de sustancias antibióticas procedentes de microorganismos del suelo (Bradford PA *et al.*, 2012). Uno de los grupos más importante estuvo liderado por el profesor Selman Waksman, que descubrió en esa época el primer antibiótico producido por un actinomiceto, la actinomicina, hoy en día utilizado en terapia antitumoral (Waksman SA *et al.*, 1940; Rahman YE *et al.*, 1974; Raggi D *et al.*, 2017). Posteriormente, en 1944, Waksman y su colaborador Albert Schatz identificaron la estreptomicina, el primer aminoglucósido natural procedente de un cultivo de *Streptomyces griseus*, que se convirtió en el primer antibiótico efectivo contra la tuberculosis, una de las enfermedades que más preocupaba en esa época (Armstrong ES *et al.*, 2012). Más adelante, al final de la década de 1940, Waskman descubrió la neomicina, el segundo aminoglucósido producido por *S. fradiae*. El trabajo de Waksman fue galardonado con el premio Nobel de Medicina en 1952 (White RJ, 2012).

Debido a que rápidamente aparecieron cepas resistentes a estreptomicina y a la toxicidad asociada al uso de la neomicina la identificación de nuevas moléculas de aminoglucósidos no cesó, y entre los años 50 y 60 nuevos grupos de investigación descubrieron la kanamicina (producida por *S. kanamyceticus*) y la gentamicina (producida por *Micromonospora echinospora*) (Umezawa H *et al.*, 1957; Weinstein Mj *et al.*, 1963). Sin embargo, de nuevo la toxicidad asociada a su uso y el hecho de que rápidamente aparecieron resistencias impulsó la búsqueda de nuevos compuestos tanto naturales como derivados sintéticos capaces de superar estos inconvenientes. La dibekacina fue el primer aminoglucósido semisintético aprobado para su uso terapéutico en 1975, y el último en aprobarse en la década de los 90 en Japón fue la arbekacina, la cual no se veía afectada por la mayoría de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (figura 6) (Jana S *et al.*, 2006; Kondo S *et al.*, 1999).

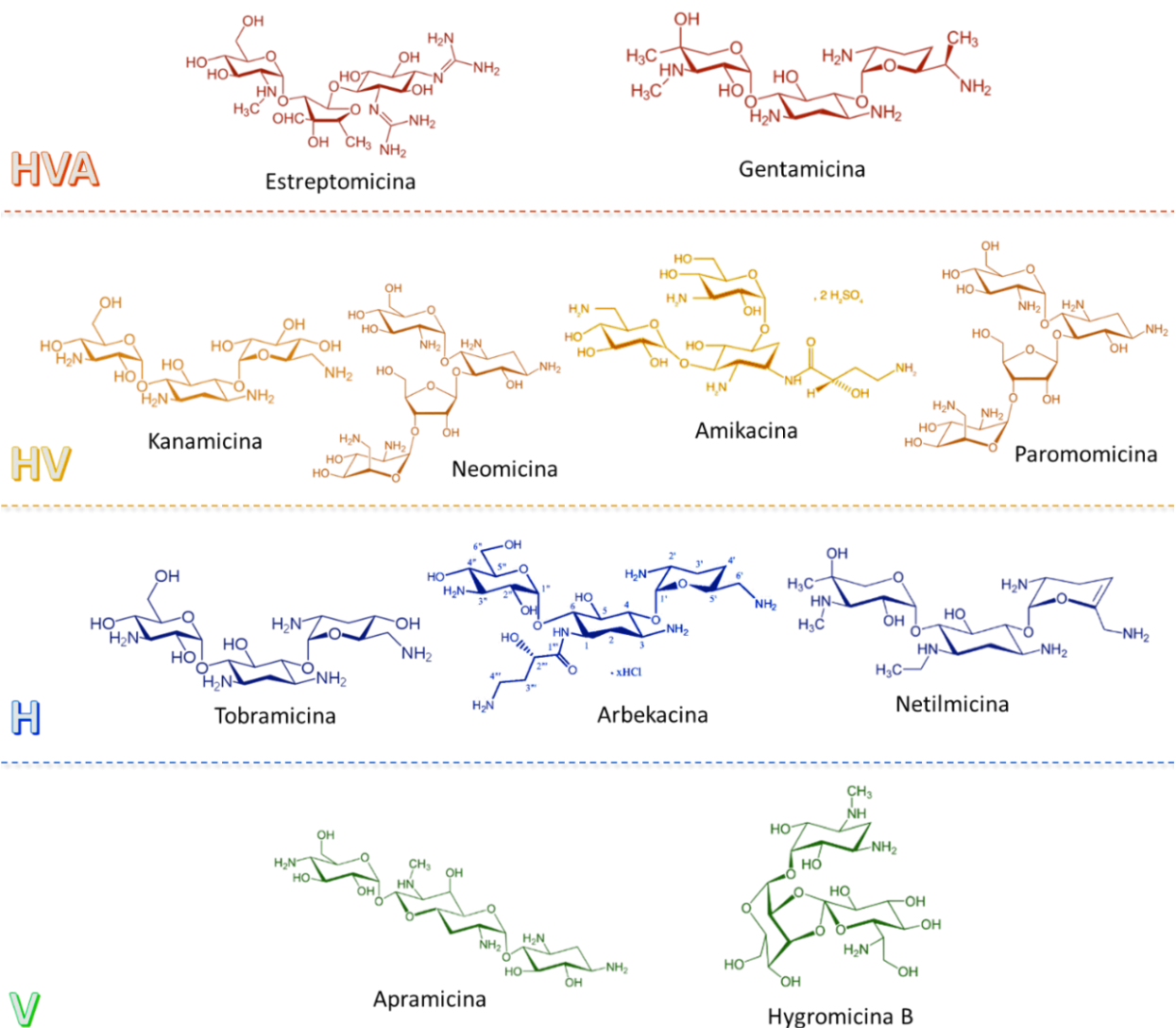


Figura 6. Estructura química de los aminoglucósidos más relevantes en la práctica clínica humana, veterinaria y en agricultura. HVA: aminoglucósidos utilizados en medicina humana, medicina veterinaria y agricultura. HV: aminoglucósidos utilizados en medicina humana y veterinaria. H: aminoglucósidos exclusivamente utilizados en medicina humana. V: aminoglucósidos exclusivamente utilizados en medicina veterinaria.

Actualmente hay un nuevo aminoglucósido derivado de la sisomicina que se encuentra en ensayos clínicos de fase III. Este compuesto no solo evade la acción de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos más comunes actualmente, sino que también ha mostrado actividad frente a patógenos resistentes a otros antibióticos por adquisición de betalactamasas o mutaciones en la diana que aportan resistencias a fluoroquinolonas, sin mostrar la toxicidad característica de los aminoglucósidos (Mega WM *et al.*, 2016; Zhanel GG *et al.*, 2012).

3.2 Estructura química y clasificación

Los aminoglucósidos presentan una estructura común conformada por un anillo aminociclitol que puede estar unido a uno o más azúcares aaminados (agrupados bajo el nombre de aminoglucósidos propiamente dichos) o no aaminados (agrupados bajo el nombre de aminociclitoles, como la espectinomomicina) a través de enlaces glucosídicos (Vicens Q *et al.*, 2002). Además de los aminoglucósidos cuyo núcleo es un aminociclitol, existen otros compuestos que, pese a que también son aminoglucósidos, su núcleo está formado por un alcohol cíclico no aaminado, como por ejemplo la kasugamicina (Bryskier (eds.)). En la actualidad, la mayoría de los aminoglucósidos se han obtenido de Actinobacterias tanto del género *Streptomyces* como *Micromonospora*, haciendo la terminación del nombre de cada compuesto referencia a este origen (Begg E J *et al.*, 1995).

Por lo tanto, los aminoglucósidos se agrupan en función de las características de su núcleo en dos grupos principales (tabla 2).

3.2.1 Aminoglucósidos típicos

El tipo de núcleo que comparten la mayoría de los aminoglucósidos de importancia clínica es el 2-desoxiestreptaminos (2-DOS). A su vez los 2-DOS pueden presentar sustituciones glucósidas en diferentes localizaciones, dividiendo a estos aminoglucósidos en distintos subgrupos: monosustituídos en la posición 4, monosustituídos en la posición 5, disustituídos en las posiciones 4 y 5 y disustituídos en las posiciones 4 y 6 (Park SR *et al.*, 2013). La localización y el número de grupos amino en los azúcares unidos al anillo desoxiestreptamino determinan la actividad biológica del antibiótico, siendo necesaria la presencia de al menos un grupo amino en el azúcar para que la molécula tenga actividad biológica (Benveniste R *et al.*, 1973).

La familia de los 4,5-disustituídos 2-DOS comprende una variedad de compuestos naturales que presentan una ribosa en su fórmula. (Bryskier (eds.)). La familia de los 4,6-disustituídos 2-DOS se divide a su vez en dos subfamilias, la de la kanamicina y la de la gentamicina. Ambas familias engloban a la mayoría de los aminoglucósidos de uso clínico, y están comprendidas tanto por compuestos de origen natural como por compuestos semisintéticos derivados de los naturales (Park SR *et al.*, 2013; Magnet Set *et al.*, 2005). La apramicina es el único miembro de la familia de los 4-monosustituídos. Es un compuesto natural producido por varios actinomicetes del género *Streptomyces* y también por otros géneros como *Sacchalopolyspora* (Matt T *et al.*, 2012). Los principales miembros de la familia de los 5-monosustituídos son la higromicina B y la destomicina A, ambos empleados como

antihelmínticos en animales y en técnicas de biología molecular en plantas (Cameron A *et al.*, 2014; Oung HM *et al.*, 2015).

3.2.2 Aminoglucósidos atípicos

Tienen por núcleo la estreptamina, actinamina o fortamina. Representan una minoría de los aminoglucósidos descubiertos hasta la fecha y, a excepción de la estreptomicina, no son tan relevantes desde el punto de vista clínico como los 2-DOS. Los compuestos más relevantes de este grupo son la estreptomicina, la espectinomicina y la fortimicina (Piepersberg W, 1995).

A partir de esta sección nos centraremos en el estudio de aminoglucósidos 2-DOS debido a su mayor relevancia clínica.

Tabla 2. Clasificación de los aminoglucósidos en base a su estructura química.

| Anillo | | Sutitución glucosídica | | Aminoglucósidos Naturales | Aminoglucósidos Semisintéticos |
|-----------------|--------------|------------------------|--------------|---|--|
| Alcohol cíclico | | 6- | | Kasugamicina | |
| Aminociclitol | Estreptamina | 4- | | Estreptomicina | |
| | Actinamina | 4,5- | | Espectinomicina | |
| | Fortamina | 6- | | Fortamicina | |
| | 2-DOS | 4,6 disustituidos | Kanamycinas | Kanamicina, Kanamicina B, Tobramicina | Amikacina, Didesoxikanamicina, Dibekacina, Arbekacina |
| | | | Gentamicinas | Gentamicina C, Gentamicina B, Micronomicina, Sisomicina, Geneticina | Isepamicina, Netilmicina |
| | | 4,5 disustituidos | | Neomicina, Paromomicina, Lividomicina, Ribostamicina, Butirosina | |
| | | 4 monosustituidos | | Apramicina | |

3.3 Mecanismo de acción

Los aminoglucósidos forman parte de los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas y, al igual que las tetraciclinas, su principal diana de actuación es la subunidad pequeña 30S del ribosoma bacteriano. Concretamente, se unen a la hélice 44 del ARN ribosómico (ARNr) 16S, la cual forma parte de la región descodificante del sitio A del ribosoma (Magnet S *et al.*, 2005). Además de esta interacción, recientemente se ha demostrado que algunos aminoglucósidos como la gentamicina y la neomicina son capaces de unirse a la hélice 69 de ARNr 23S de la subunidad grande del ribosoma bacteriano. Esta unión inhibe el proceso de reciclado ribosomal, necesario para preparar al ribosoma para una nueva síntesis de proteínas, en el que las dos subunidades ribosomales, 30S y 50S, se separan (Janosi L *et al.*, 1996; Wang L *et al.*, 2012).

En su unión a la hélice 44 del ARNr 16S, los aminoglucósidos interaccionan con el bolsillo formado por los nucleótidos universalmente conservados en las posiciones A1492 y A1493 y con el nucleótido específico de procariotas A1408 (Recht MI *et al.*, 1999). En la síntesis proteica, este bolsillo es clave en el mecanismo de chequeo de la correcta lectura del ribosoma, diferenciando la formación de complejos ARNt-ARNm correctos o erróneos (Carter AP *et al.*, 2000). De tal manera que un ARNt cuyo anticodón no se complementa con el codón del ARNm, hace que la orientación de A1492 y A1493 se distorsione y no se formen los puentes de hidrógeno necesarios entre el ribosoma y el ARNm que desencadenan la transpeptidación y la translocación (Matheson, A. T *et al.*, 2000). En presencia de aminoglucósidos la discriminación entre complejos codón-anticodón erróneos y no erróneos no se lleva a cabo, lo que da lugar a una disminución de la fidelidad en la traducción, creando proteínas aberrantes (Carter AP *et al.*, 2000).

Recientemente se ha comprobado que algunos aminoglucósidos ejercen su principal acción en otras etapas de la traducción, como son la rotación y translocación del ribosoma (Tsai A *et al.*, 2013). Es el caso tanto de la apramicina, que actúa ralentizando la translocación y por consiguiente bloqueándola, sin afectar a la correcta monitorización codón-anticodón, como de la gentamicina y paromomicina, que aunque sí van a alterar la fidelidad de la traducción, actúan principalmente por ralentización tanto de la rotación del ribosoma como de la translocación (Fourmy D *et al.*, 1998; Feldman MB *et al.*, 2010; Tsai A *et al.*, 2013).

Para alcanzar el ribosoma los aminoglucósidos deben llegar al citoplasma bacteriano. El traspaso de la membrana exterior de las Gram negativas y la pared celular tanto de Gram negativas como positivas se realiza por unión electrostática en un proceso que no requiere

energía. Sin embargo, el paso a través de la membrana citoplasmática requiere energía, que van a obtener de un proceso dependiente de oxígeno, por ello, como veremos más adelante, son antibióticos menos activos en microorganismos anaerobios (Taber HW *et al.*, 1987).

3.4 Propiedades y toxicidad

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas de amplio espectro cuyas propiedades farmacocinéticas y potencia están estrechamente relacionadas con sus características químicas.

Son hidrofílicos, relativamente insolubles en lípidos y muestran mayor actividad en condiciones básicas de pH (Bryskier libro). Por estas propiedades los aminoglucósidos son antibióticos pobremente absorbidos cuando se administran oralmente y, por tanto, deben ser administrados por vía parenteral para el tratamiento de infecciones sistémicas (Turnidge J, 2003). En general todos los aminoglucósidos presentan un volumen de distribución bajo (0.11-0.3 l) y vida media similar (2-3 h), con escasa penetración a través de la barrera hematoencefálica (Turnidge J, 2003). La eliminación se lleva a cabo predominantemente por filtración glomerular a través del riñón.

La administración oral puede ser útil cuando se pretenda eliminar la microbiota intestinal antes de una intervención quirúrgica (Vakulenko SB *et al.*, 2003). La aplicación inhalatoria de aminoglucósidos se emplea como complemento en el tratamiento de infecciones respiratorias, ya que permite disminuir la absorción sistémica de los aminoglucósidos y con ello minimizar sus efectos tóxicos (Mohr AM *et al.*, 2007). La terapia convencional recomendada se basa en múltiples dosis diarias, sin embargo, en pacientes con una actividad renal normal, la aplicación de dosis únicas aporta una eficacia similar a la de múltiples dosis diarias pero minimiza los efectos tóxicos (Freeman CD *et al.*, 1997; Turnidge J, 2003).

Uno de los mayores problemas asociados a los aminoglucósidos es su tendencia a causar efectos adversos. Los aminoglucósidos tienen carga positiva, es decir, son cationes, y por ello se van a unir a diferentes membranas celulares y moléculas aniónicas intracelulares como fosfolípidos, ADN o ARN, lo que incrementa su toxicidad (Vicens Q *et al.*, 2002). Además, a pesar de que los aminoglucósidos se eliminan fácilmente por vía renal de la mayoría de los tejidos y órganos (Turnidge J, 2003), pueden acumularse en células de los túbulos renales así como en la endolinfa y perilinfa del oído interno (Henley CM *et al.*, 1988). Todo ello contribuye a la aparición de los efectos secundarios, que se van a asociar con toxicidad en el sistema renal, vestibular y

de audición, y en raras ocasiones también con toxicidad nerviosa (figura 7) (Fischel-Ghodsian N, 2005; Grill MF *et al.*, 2011; McWilliam SJ *et al.*, 2016).

La ototoxicidad es la mayor desventaja que presenta el uso de aminoglucósidos debido a que sus efectos son irreversibles, al contrario de lo que sucede con la nefrotoxicidad cuyo daño puede ser revertido (Fischel-Ghodsian N, 2005). En ambos casos la toxicidad es causada por la interacción del aminoglucósido con la mitocondria de las células eucariotas (Hobbie SN *et al.*, 2008; Zorov DB, 2010)

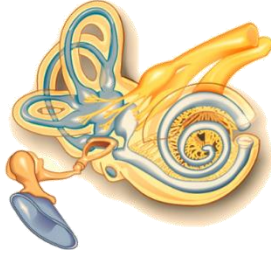


| OTOTÓXICOS | NEFROTÓXICOS | NEUROTÓXICOS |
|--|--|---|
| <p>Toxicidad coclear Hipoacusia neurosensorial bilateral irreversible</p> <p>Toxicidad vestibular Vértigo Nauseas Vómitos Nistagmos Ataxia</p>  | <p>Reducción y alteraciones en la filtración glomerular (proteinuria, glucosuria, alteraciones electrolíticas, etc.) Síndrome similar a Bartter</p> <p>Fallo renal crónico</p>  | <p>Neuropatía periférica Encefalopatía Bloqueo neuromuscular Parestesia</p>  |

Figura 7. Resumen de los posibles efectos tóxicos producidos por la administración de aminoglucósidos (Xie J *et al.*, 2011; Grill MF, 2011; Oliveira JFP *et al.*, 2006).

En la aparición de estos efectos tóxicos influyen diversos factores como el tipo de aminoglucósido que se utilice, la dosis y duración del tratamiento, la combinación con otros medicamentos, la edad del paciente, su predisposición genética o su funcionalidad renal previa (Paterson DL *et al.*, 1998; Xie J *et al.*, 2011). Dosis más altas que las convencionales o dosis convencionales mantenidas durante un tiempo prolongado se asocian más a la aparición de efectos tóxicos que dosis únicas diarias durante periodos cortos de tiempo (Beaucaire G, 2000). Por tanto, uno de los medios más efectivo, menos costoso y que más se está llevando a cabo para evitar la aparición de estos efectos tóxicos consiste en realizar una cuidadosa planificación de la pauta de administración (Prayle A *et al.*, 2010).

3.5 Uso

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas de amplio espectro, es decir, muestran actividad frente a una gran variedad de bacterias Gram negativas y Gram positivas. No obstante, también existen bacterias que de forma natural resisten a la acción de los aminoglucósidos, entre las que destacan bacterias anaerobias (debido a que requieren de oxígeno para penetrar en la célula como vimos anteriormente), *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Legionella* spp. y *Mycoplasma* spp. (Yao J *et al.*, 2007).

Desde que se empezaron a utilizar los aminoglucósidos casi en exclusividad por la falta de otras opciones terapéuticas, se han ido desarrollando otras clases y generaciones de antibióticos más efectivos y con menos toxicidad, que ha propiciado que el uso de los aminoglucósidos se viera disminuido, sin embargo, hoy en día siguen siendo uno de los principales grupos de antibióticos utilizados en medicina humana, veterinaria e inclusive agrícola (WHO, 2007).

3.5.1 Medicina humana

La gentamicina, la tobramicina y la amikacina son los aminoglucósidos que más se utilizan en la práctica clínica para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., etc. (Yao J *et al.*, 2007). La netilmicina, amikacina o arbekacina son aminoglucósidos reservados para el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias resistentes a otros aminoglucósidos (Davies JE, 2006). La estreptomycinina sigue utilizándose en el tratamiento de la tuberculosis como alternativa de primera línea cuando aparecen resistencias a los antibióticos antituberculosos de elección. En caso de aparecer resistencias a la estreptomycinina, como antibióticos de segunda línea se utilizan también la amikacina o kanamicina (Brossier F *et al.*, 2010). La arbekacina es efectiva contra *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Davies JE, 2006).

El uso de aminoglucósidos también se ha descrito para tratar enfermedades de etiología no bacteriana, como desórdenes genéticos (fibrosis quística, síndrome de Hurler, distrofia muscular de Duchenne), la enfermedad de Ménière e incluso se les ve como posibles candidatos en el tratamiento del VIH al inhibir la replicación del virus, o como agentes antifúngicos y antiparasitarios (Lee HB *et al.*, 2005; Houghton JL *et al.*, 2010; Kappagoda S *et al.*, 2011; Syed MI *et al.*, 2015).

Una de las claves del éxito de los aminoglucósidos es que muestran actividad sinérgica cuando se administran con otros antibióticos que mejoran su captación por parte de la célula bacteriana, como son por ejemplo los betalactámicos (Bollenbach T, 2015).

3.5.2 Medicina veterinaria y agrícola

En veterinaria los aminoglucósidos se emplean frecuentemente, tanto en animales de abasto como en animales de compañía, en el tratamiento de infecciones importantes como septicemias, infecciones respiratorias, urinarias y del tracto digestivo (CVMP, 2014). Pese a que su absorción es pobre por vía oral, esta es la principal vía de administración junto con la parenteral (intravenosa, intramuscular o subcutánea), pudiendo utilizarse, aunque menos frecuentemente, por vía tópica o en preparaciones intramamarias (CVMP, 2014; Oishi N *et al.*, 2012). La apramicina es el único aminoglucósido, con fin antibiótico, que se utiliza exclusivamente en animales, pero junto a este se pueden utilizar la neomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomina y la amikacina, esta última solo permitida en animales de compañía (CVMP, 2014; Matt T, 2012).

Además de su uso bactericida, los aminoglucósidos se pueden emplear en animales a modo de antihelmínticos, como es el caso de la paromomicina, la hygromicina B o la destomicina A.

El uso de los aminoglucósidos también se ha extendido a la agricultura, aunque en este campo su utilización es mucho menos frecuente. La estreptomina es el antibiótico que más se utiliza en el tratamiento de enfermedades de los cultivos, principalmente contra el Fuego Bacteriano causado por *Erwinia amylovora*, aunque también se utiliza en el control de otras enfermedades (la podredumbre blanda, la enfermedad del tizón, etc.). La gentamicina también se usa con estos fines, aunque su uso se circunscribe más a Latinoamérica (McManus PS *et al.*, 2002; Duffy B *et al.*, 2014).

3.6 Mecanismos de resistencia

La resistencia a aminoglucósidos se consigue a través de diferentes mecanismos que provocan tres efectos: reducción de la concentración intracelular del aminoglucósido, modificación de la diana de actuación y modificación de la estructura del antibiótico (Doi Y *et al.*, 2016).

3.6.1. Reducción de la concentración intracelular de los aminoglucósidos

La disminución en la concentración del antibiótico dentro de la célula bacteriana, con la consiguiente menor unión a su diana de actuación, se puede conseguir por dos vías: I) Mecanismos que disminuyen la permeabilidad de la entrada de aminoglucósidos al citoplasma bacteriano, bien por cambios en la cargas electrostáticas de los lipopolisacáridos de la membrana plasmática, o bien por alteraciones en el transporte de la cadena de electrones que dificulten la actividad respiratoria; II) Mecanismos de extrusión hacia el exterior celular del antibiótico que ha conseguido alcanzar el citoplasma bacteriano a través de bombas de eflujo, mayoritariamente de la familia RND, aunque también se ha comprobado la participación de bombas de eflujo MFS en ciertas especies bacterianas (Poole K, 2005a ; Poole K, 2005b).

3.6.2. Modificación enzimática de la estructura de los aminoglucósidos

Existe una gran variedad de enzimas modificadoras de aminoglucósidos presentes en todo tipo de bacterias y entornos genéticos, gracias tanto a su alta capacidad de mutagénesis, que continuamente está generando nuevas variantes, como a su capacidad de transferirse horizontalmente a nivel molecular (a través de integrones, cassettes genéticos, transposones o elementos integrativos conjugativos) y celular (conjugación bacteriana, transformación natural o transducción) (Ramírez MS *et al.*, 2010). Por ello, de todos los mecanismos de resistencia frente a aminoglucósidos, este es sin duda el más prevalente, asociándose tanto a plásmidos como a cromosomas de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Ramírez MS *et al.*, 2010).

La modificación enzimática la realizan sobre grupos moleculares de la estructura del aminoglucósido que son esenciales para la interacción posterior del antibiótico con el ribosoma. De tal manera que en función de cómo lleven a cabo esa modificación las enzimas se clasifican en tres grupos, dentro de los cuales se encuentran distintas clases y dentro de estas en algunos casos distintos subclases:

- I) Aminoglucósido N-acetiltransferasas (AACs): catalizan la acetilación de los grupos –NH₂ de la molécula del aminoglucósido. En función de la posición del grupo amino sobre el que actúen tenemos 4 clases de enzimas, de las cuales la más prevalente claramente es la AAC('6) (Ramírez MS *et al.*, 2010).
- II) Aminoglucósido O-nucleotidiltransferasas (ANTs): catalizan la adenilación un grupo -OH del aminoglucósido. Existen 5 tipos de ANTs en función de la posición del grupo hidroxilo que catalicen (Ramírez MS *et al.*, 2010).

- III) Aminoglucósido O-fosfotransferasa (APHs): catalizan la fosforilación de los grupos hidroxilos del aminoglucósido, existiendo 7 tipos en función de la posición que fosforilen (Ramirez MS *et al.*, 2010).

3.6.3. Modificación de la diana de actuación de los aminoglucósidos

La modificación de la subunidad 30S ribosomal para que no se produzca interacción con los aminoglucósidos puede ocurrir por varios mecanismos: por mutación del ARNr 16S o de proteínas ribosomales, o por modificaciones post-transcripcionales mediante la metilación del ARNr 16S (Magnet S *et al.*, 2005; Doi Y *et al.*, 2016).

En general se ha observado que las mutaciones en el ARNr 16S no constituyen un mecanismo de resistencia común entre bacterias patógenas, ya que son regiones altamente conservadas y la mayoría de mutaciones en esta zona son letales (Gregory ST, 2005; Doi Y *et al.*, 2016). De tal manera que se podría considerar que el único caso relevante desde el punto de vista clínico es la resistencia a estreptomicina por mutaciones en el ARNr 16S y en la proteína S12 de *Mycobacterium tuberculosis*, que confiere altos niveles de resistencia debido a que solo tiene una copia del operón ribosómico (Dobner P *et al.*, 1997). Por el contrario, las modificaciones post-transcripcionales sí son relevantes en la práctica clínica (Doi Y *et al.*, 2016).

3.6.3.1 Metilaciones post-transcripcionales del ARNr 16S

Este mecanismo de resistencia es el más reciente de los mecanismos de resistencia que afectan a aminoglucósidos (Cantón R, 2009). Está mediado por enzimas metiltransferasas del ARNr 16S, comúnmente denominadas metilasas o metiltransferasas, las cuales van a añadir un grupo metilo en residuos de nucleótidos que se localizan en el sitio de unión de los aminoglucósidos en el ARNr, impidiendo la interacción del ribosoma con el antibiótico necesaria para que se produzca la acción del aminoglucósido (Doi Y *et al.*, 2016). Este mecanismo de resistencia se encuentra presente de forma natural en bacterias productoras de aminoglucósidos como un mecanismo de autodefensa, pues les confiere altos niveles de resistencia frente a los mismos (Wachino J *et al.*, 2012).

Sin embargo, su importancia radica en que recientemente las bacterias patógenas han adquirido este mecanismo, que rápidamente se ha ido diseminando exclusivamente entre distintas especies bacterianas Gram negativas, adquiriendo una gran importancia a nivel clínico

debido a que confiere altos niveles de resistencia frente a los aminoglucósidos utilizados en la clínica (Garneau-Tsodikova S *et al.*, 2016; Wachino J *et al.*, 2012).

3.6.3.1.1. Metiltransferasas adquiridas

En función del nucleótido en que produzcan la modificación, residuo N7 en G1405 o residuo N1 en A1408, las metilasas se clasifican en dos familias, Arm y Pam respectivamente (Savic M *et al.*, 2009; Wachino J *et al.*, 2007). En ambos casos las enzimas requieren como sustrato la subunidad ribosomal 30S madura, es decir, formada por el ARNr 16S y las proteínas ribosomales; no van a introducir la metilación en el ARNr 16S desnudo (Zarubica T *et al.*, 2011; Dunkle JA *et al.*, 2014).

Dentro de la familia Arm (en inglés *Aminoglycoside Resistance Methyltransferase*) se han descrito nueve genes de resistencia: *armA*, *rmtA-rmtH* y cuatro variantes, mientras que dentro de la familia Pam (en inglés *Pan-Aminogluco-side resistance Methyltransferase*) tan solo se ha descrito el gen *npmA* (Savic M *et al.*, 2009).

Las metilasas de la familia Arm confieren resistencia a los aminoglucósidos 4,6-2-DOS, pero mantienen la susceptibilidad frente a los 4,5-2-DOS, los 1-DOS y los aminoglucósidos que tienen por anillo otro grupo diferente al DOS como la estreptomicina. Por el contrario, *npmA* confiere también resistencia frente a 4,6-2-DOS, pero confiere más altos niveles de resistencia frente a los 4,5-2-DOS y 1-DOS, y se mantiene susceptible frente a los no-DOS (Wachino J *et al.*, 2012).
























Desde que en 2003 se publicara la identificación de las primeras metilasas que conferían resistencia a aminoglucósidos, RmtA y ArmA, otras 12 metiltransferasas han ido describiéndose a lo largo del tiempo, en diferentes países y diferentes especies bacterianas Gram negativas, aisladas tanto de muestras humanas como de animales (de producción y de compañía), de alimentos y del medio ambiente (tabla 3) (Yokoyama K *et al.*, 2003; Galimand M *et al.*, 2003; Doi Y *et al.*, 2016).

Las metiltransferasas adquiridas son genes que se encuentran incluidos en diversos tipos de elementos genéticos móviles como transposones o integrones, lo cual permite su movilización dentro del genoma bacteriano (Wachino J *et al.*, 2012). En general, estos elementos móviles se van a localizar en plásmidos transferibles tanto de amplio como de estrecho rango de hospedadores, lo que posibilita que, además de la transmisión vertical, puedan transmitirse horizontalmente, acelerando su diseminación (Wachino J *et al.*, 2012). Además, las metilasas

asociadas a estas plataformas genéticas móviles también se han identificado integradas en el cromosoma bacteriano (Wachino J *et al.*, 2012; O'Hara JA *et al.*, 2013; Hopkins KL *et al.*, 2010; Rahman M *et al.*, 2015).

Una de las principales preocupaciones asociada a las metilasas es su frecuente coexistencia a nivel bacteriano y/o plasmídico con otros tipos de metiltransferasas y, sobre todo, con genes de resistencia frente a otros antibióticos relevantes en la práctica clínica, principalmente betalactámicos y fluoroquinolonas (Wachino J *et al.*, 2012). El tratamiento de elección ante infecciones producidas por bacterias Gram negativas es la monoterapia con betalactámicos, sin embargo, cuando se observan resistencias frente a estos antibióticos, la mejor alternativa es el uso de aminoglucósidos o fluoroquinolonas (Tängdén T, 2014). Por lo tanto, la asociación de metilasas junto a betalactamasas/carbapenemasas y genes de resistencia transferibles a quinolonas, ya sean proteínas protectoras (proteínas Qnr), enzimas modificadoras (aac(6')-Ib-cr) o bombas de eflujo (QepA), reduce enormemente la posibilidades de éxito terapéutico en el tratamiento de infecciones causadas por patógenos multirresistentes (Liu JH *et al.*, 2008; Ruiz J *et al.*, 2012; Wei DD *et al.*, 2015) llevándonos al uso de antibióticos de último recurso como la tigeciclina o la colistina.

Tabla 3. Características de todas las metiltransferasas y sus variedades descubiertas hasta la fecha.

| Metilasas | Año de publicación | Especie bacteriana | Prevalencia | Distribución | Origen |
|-----------|--------------------|--|-------------|-------------------------------------|---|
| ArmA | 2003 | Enterobacterias <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Muy alta | Mundial |     |
| RmtA | 2003 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> | Muy Baja | Japón Corea Suiza |  |
| RmtB | 2004 | Enterobacterias <i>A. baumannii</i> | Muy alta | Mundial |    |
| RmtB2 | 2012 | <i>Enterobacter cloacae</i> | Muy baja | México |  |
| RmtB3 | 2012 | Enterobacterias | Muy baja | EE.UU México |  |
| RmtC | 2006 | Enterobacterias | Alta | Mundial |   |
| RmtD | 2007 | Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i> | Alta | Brasil Chile Argentina |    |
| RmtD2 | | Enterobacterias | Muy baja | Argentina Brasil |  |
| RmtE | 2010 | <i>E. coli</i> | Muy Baja | EE.UU |   |
| RmtE2 | 2015 | <i>E. coli</i> | Muy Baja | China |  |
| RmtF | 2012 | Enterobacterias <i>P.aeruginosa</i> | Alta | India Nepal Reino Unido |  |
| | | | Muy Baja | Egipto Australia EE.UU Sudáfrica | |
| RmtG | 2013 | Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i> | Baja | Sudamérica India EE.UU |  |
| RmtH | 2013 | <i>K. pneumoniae</i> | Muy baja | Iraq |  |
| NpmA | 2007 | Enterobacterias | Muy baja | Japón Arabia Saudi |  |

RmtB2 tiene 3 cambios aminoacídicos con respecto RmtB, RmtB3 tiene 1 cambio aminoacídico con respecto RmtB, RmtD2 tiene 9 cambios aminoacídicos con respecto RmtD (también denominada RmtD1), RmtE2 tiene 1 cambio aminoacídico con respecto RmtE. (Bueno MF *et al.*, 2017; Filgona J *et al.*, 2015; Gamal D *et al.*, 2016; Rahman M *et al.*, 2015; Sidjabat HE *et al.*, 2015, Lee CS *et al.*, 2014; Rubin JE *et al.*, 2014; Tada T *et al.*, 2013; Xia J *et al.*, 2015; Lee CS *et al.*, 2015; Tijet N *et al.*, 2011; Bueno MF *et al.*, 2013; Fontes LC *et al.*, 2011; Leigue L *et al.*, 2015; Doi Y *et al.*, 2007; Xu G *et al.*, 2015; Hopkins KL *et al.*, 2010; Castanheira M *et al.*, 2012; O'Hara JA *et al.*, 2013; Wachino J *et al.*, 2012; Doi Y *et al.*, 2016).

IV. COLISTINA

4.1 Historia de las polimixinas

En los años 40 se llevaban a cabo múltiples programas de búsqueda de microorganismos del suelo productores de sustancias antimicrobianas (Bradford PA *et al.*, 2012). Curiosamente, en 1947 tres grupos independientes identificaron 5 compuestos que presentaban el mismo espectro antibacteriano, eran activos en las mismas concentraciones, todos ellos eran producidos por *Bacillus polymyxa*, una bacteria del suelo Gram positiva, aunque químicamente mostraban diferencias (Sebek OK, 1967). Estos compuestos se englobaron bajo el nombre de polimixinas y designaron alfabéticamente como polimixinas A, B, C, D, y E (esta última se demostró en 1963 que era idéntica a la colistina, antibiótico descubierto en Japón en 1949) (Sebek OK, 1967; White RJ; 2012). Posteriormente se han identificado otros compuestos como la polimixina M (Sebek OK, 1967).

No obstante, su interés clínico rápidamente se vio comprometido por su alta nefrotoxicidad (Bradford PA *et al.*, 2012). De tal manera que la polimixina B y E, que eran las que presentaban menor toxicidad, fueron las únicas que se introdujeron en los años 50 en la práctica clínica para tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram negativas (Sebek OK, 1967; Kaye KS *et al.*, 2016). No obstante, puesto que la toxicidad seguía siendo elevada y fueron surgiendo alternativas terapéuticas menos tóxicas, como por ejemplo los aminoglucósidos, a mediados de la década de los 70 se abandonó su uso en medicina humana pero se mantuvo en medicina veterinaria, principalmente en la producción porcina, donde además se utilizó en cantidades masivas (Kaye KS *et al.*, 2016; Rhouma M *et al.*, 2016b).

A raíz de la combinación de dos factores críticos en las dos últimas décadas, como son la falta de descubrimiento de nuevos tipos de antibióticos y el incremento de infecciones producidas por bacterias multirresistentes, la colistina ha resurgido como una alternativa eficaz, pues en contra de su toxicidad presenta propiedades como un rápido efecto bactericida y un lento desarrollo de resistencia (Loho T *et al.*, 2015; Bialvaei AZ *et al.*, 2015). Estas circunstancias convierten a la colistina en un antibiótico de último recurso (Jeannot K *et al.*, 2017). En los últimos años se están desarrollando nuevos compuestos derivados de las polimixinas que

mantengan su actividad pero resulten menos tóxicos, y actualmente se encuentran en fase de estudios preclínicos (Vaara M, 2010).

4.2 Estructura y clasificación de las polimixinas

Las polimixinas son pequeñas moléculas de lipopéptidos anfipáticos policationicos que presentan un anillo heptapeptídico unido a un tripéptido corto que sobresale y se une a una cola de ácidos grasos hidrofóbicos (Trimble MJ *et al.*, 2016; Cai Y *et al.*, 2015). Las polimixinas de uso clínico, polimixina B y colistina, presentan una estructura tremendamente similar, diferenciándose únicamente en el tipo de aminoácido que presentan en la posición 6, D-fenilalanina en la polimixina B y D-leucina en la colistina, lo cual favorece que tengan una actividad muy similar, llegando a producirse resistencias cruzadas (figura 8) (Kaye KS *et al.*, 2016; Trimble MJ *et al.*, 2016).

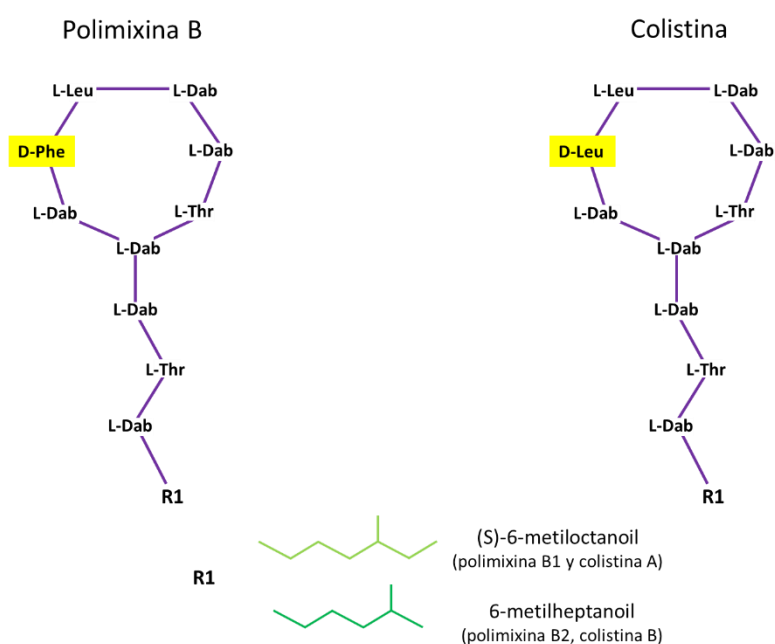


Figura 8. Estructura química de la polimixina B y la colistina. R1: cadena de ácidos grasos. Dab: ácido diaminobutírico. Thr: treonina. Leu: leucina. La diferencia aminoacídica entre ambos compuestos se encuentra resaltada en amarillo.

En función de las características de la cadena de ácidos grasos, tanto la polimixina B como la colistina se dividen en subtipos, de tal manera que las formulaciones comerciales contienen los diferentes componentes activos en distintas proporciones en función de los fabricantes y de los lotes (Cai Y *et al.*, 2015). Los componentes activos mayoritarios de la

polimixina B son la polimixina B1 y B2, que se diferencian en la cadena de ácidos grasos a la que están unidos, siendo (S)-6-metiloctanoil y 6-metilheptanoil respectivamente (Cai Y *et al.*, 2015). En el caso de la colistina, los componentes activos mayoritarios de las formulaciones comerciales son la colistina A ((S)-6-metiloctanoil) y colistina B (6-metilheptanoil) (Cai Y *et al.*, 2015). El carácter anfipáticos se deriva de la hidrofobicidad proporcionada por la cadena de ácidos grasos y la hidrofiliidad derivada de los cinco grupos diaminobutíricos (Rhouma M *et al.*, 2016b). Además, estos cinco residuos diaminobutíricos presentan aminos cargados positivamente cuando se encuentran a pH fisiológico, lo que le otorga la capacidad policatiónica a la molécula (Bialvaei AZ *et al.*, 2015; Rhouma M *et al.*, 2016b).

4.3 Mecanismo de acción de las polimixinas

Pese a que el mecanismo de actuación de las polimixinas no está completamente dilucidado, sí se sabe que actúan perturbando la integridad de las membranas externa e interna (o citoplasmática) a través de la “captación autopromovida” derivada de su carácter anfipático, induciendo el efecto bactericida muy rápidamente (Bialvaei AZ *et al.*, 2015; Cai Y *et al.*, 2015; Kaye KS *et al.*, 2016).

La diana de acción de las polimixinas es la región lípido A de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa. Consecuentemente, las bacterias Gram positivas, que no presentan membrana externa, no son susceptibles a las polimixinas (Dijkmans AC *et al.*, 2015). Los fosfoésteres del lípido A están asociados a los cationes divalentes de Mg^{2+} y Ca^{2+} , los cuales unen y estabilizan las moléculas de LPS adyacentes, es decir, contribuyen al mantenimiento estructural (Aguayo A *et al.*, 2016). Las aminos de las polimixinas se encuentran cargadas positivamente a pH fisiológicos, lo que les permite interactuar con los fosfatos del lípido A cargados negativamente (figura 9 A) (Trimble MJ *et al.*, 2016). A raíz de esta interacción, se produce un desplazamiento repulsivo de los cationes del lípido A (Mg^{2+} y Ca^{2+}) induciéndose una desestabilización de la membrana externa (figura 9 B), lo cual produce los primeros efectos perjudiciales para la bacteria, ya que permite el paso de moléculas que antes eran no permeables o débilmente permeables e induce la fuga de proteínas periplásmicas (Trimble MJ *et al.*, 2016). Este momento es aprovechado por la polimixina que, gracias a su carácter hidrofóbico, va a penetrar en la capa fosfolipídica de la membrana externa alcanzando el espacio periplásmico y la membrana citoplasmática y, por mecanismos aún no conocidos, generará una fusión de la membrana externa e interna, que conllevará cambios en la estructura fosfolipídica

que finalmente producirán el efecto bactericida (figura 9 C) (Trimble MJ *et al.*, 2016; Aguayo A *et al.*, 2016).

Además de inducir el efecto bactericida por desestabilización de las membranas bacterianas, las polimixinas tienen la capacidad de neutralizar el efecto endotóxico producido por el lípido A (Bialvaei AZ *et al.*, 2015).

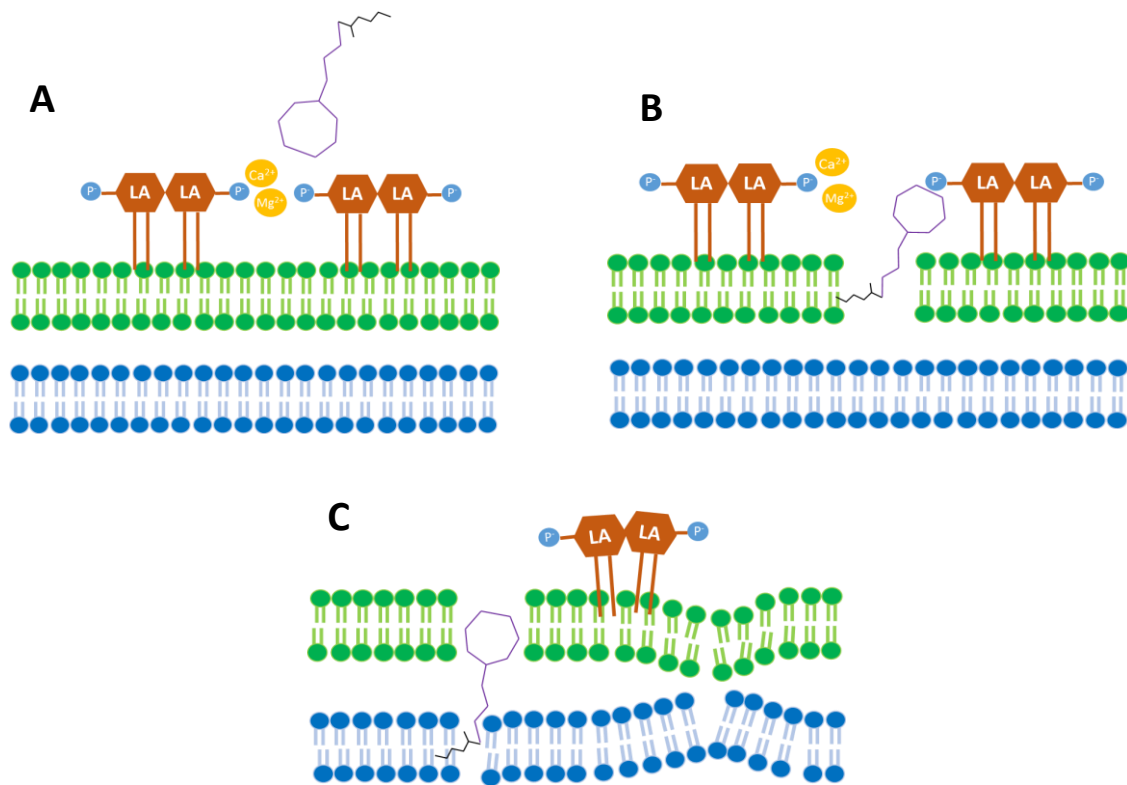


Figura 9. Mecanismo de acción de las polimixinas. LA: lípido A del LPS. P: fosfato cargado negativamente. Ca^{2+} y Mg^{2+} : iones calcio y magnesio cargados positivamente. En color verde se muestra la bicapa fosfolipídica de la membrana externa y en color azul la membrana fosfolipídica interna.

4.4 Propiedades

A partir de ahora nos centraremos en la colistina o polimixina E.

La colistina es un bactericida con un espectro de actuación estrecho, pues solo es eficaz contra bacterias aerobias, Gram negativas como enterobacterias, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* y también contra algunas especies de micobacterias, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis* (Karaïskos I *et al.*, 2017). Existen especies resistentes intrínsecamente como todas las bacterias Gram positivas, los

cocos Gram negativos, algunas enterobacterias (*Proteus* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp. y *Edwardesiella* spp.) así como *Brucella* o *Burkholderia* (Karaikos I *et al.*, 2017). Sin embargo, la importancia de la colistina radica en que todavía muestra actividad contra bacterias multirresistentes y extensamente resistentes, incluyendo aquellas productoras de carbapenemasas (Karaikos I *et al.*, 2017).

Existen dos formulaciones químicas de colistina que se pueden utilizar en clínica y que serán completamente diferentes en cuanto a propiedades y utilización, el sulfato de colistina (colistina) y el colistinmetato de sodio o CMS (Bialvaei AZ *et al.*, 2015). El CMS es una forma inactiva que debe convertirse en colistina dentro del organismo para ejercer su acción, sin embargo, solo una pequeña fracción es hidrolizada a colistina, mientras que la mayor parte de la dosis es eliminada vía renal (Dijkmans AC *et al.*, 2015; Bialvaei AZ *et al.*, 2015). El CMS puede administrarse tanto por vía parenteral como a través de aerosoles, mientras que la colistina puede administrarse vía oral, tópica e inhalatoria. (Dijkmans AC *et al.*, 2015; Bialvaei AZ *et al.*, 2015).

Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la colistina son muy variables en función de la bibliografía que se consulte. En general el CMS tiene una vida media corta (máximo de 5 horas en pacientes con problemas renales) en comparación con la colistina (que puede llegar a 18 horas en esos pacientes) y ambas se eliminan vía renal (Dijkmans AC *et al.*, 2015).

El régimen general de administración de la colistina va a depender de varios factores: el tipo de colistina administrada (CMS o colistina), la vía de administración (inhalatoria o intravenosa), el peso del paciente y su capacidad renal (función renal normal o función renal alterada) (Michalopoulos AS *et al.*, 2011; Dijkmans AC *et al.*, 2015). En general, se ha observado que la utilización de terapia combinada de colistina con otros antibióticos, como por ejemplo carbapenemas tiene una mayor efectividad que la monoterapia de colistina (Vardakas KZ *et al.*, 2016).

4.5 Toxicidad

Uno de los principales problemas asociados al uso de colistina (al igual que la polimixina B) es su capacidad de inducir nefrotoxicidad y neurotoxicidad, lo cual hizo que durante unos años no se utilizara en medicina humana (Kaye KS *et al.*, 2016). También puede causar otros

efectos adversos menos comunes, como dolor en la zona de inyección intramuscular, reacciones de hipersensibilidad o bronquiespamos tras la administración inhalatoria (Cai Y *et al.*, 2015).

La nefrotoxicidad es el efecto adverso más frecuente, es dosis dependiente y normalmente es reversible, aunque no siempre (Javan AO *et al.*, 2015). El daño renal se produce por la captación de colistina por parte de las células tubulares del riñón, lo cual induce a su apoptosis (Cai Y *et al.*, 2015). Como consecuencia de esta necrosis tubular se produce una disminución en la eliminación de la creatinina incrementándose los niveles de urea y nitrógeno en sangre, pudiendo llegar a causar oliguria, proteinuria o cilindruria (Javan AO *et al.*, 2015). Existen factores que incrementan el riesgo de nefrotoxicidad, como son la dosis y duración del tratamiento (dosis únicas diarias inducen menor toxicidad que múltiples dosis), factores relacionados con el paciente (edad, sexo, gravedad de su situación, enfermedades concomitantes) o la administración conjunta con otros fármacos nefrotóxicos (Javan AO *et al.*, 2015; Cai Y *et al.*, 2015).

La neurotoxicidad se produce por inhibición de los receptores de acetilcolina o la inhibición de la liberación de la acetilcolina, de tal manera que se produce un bloqueo neuromuscular capaz de causar, entre otros efectos, parestesia, mareos, neuropatía, sordera parcial, alteraciones oculares, psicosis, convulsiones e incluso en algunos casos dificultad respiratoria o apnea (Cai Y *et al.*, 2015; Javan AO *et al.*, 2015). Estos efectos son menos frecuentes que los nefrotóxicos, son siempre reversibles y van a depender de la dosis administrada, apareciendo en mayor proporción en mujeres, pacientes con largos tratamientos o con función renal comprometida (Cai Y *et al.*, 2015; Javan AO *et al.*, 2015).

4.5 Usos

4.5.1 Uso clínico en medicina humana

En función del tipo de infección a tratar se recomienda una vía de administración diferente, de tal manera que la vía más utilizada es la intravenosa, seguida por la vía inhalatoria y en menor grado la oral (figura xx) (Wertheim H *et al.*, 2013). En general su uso se recomienda en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram negativas multirresistentes (Loho T *et al.*, 2015).

La administración intravenosa de la colistina está indicada para el tratamiento de septicemias, neumonías e infecciones asociadas a catéteres (Wertheim H *et al.*, 2013). La colistina aerosolizada se reserva para el tratamiento y la prevención de infecciones causadas por

P. aeruginosa en pacientes con fibrosis quística, así como para el tratamiento de neumonías adquiridas en el hospital (Loho T *et al.*, 2015; Dijkmans AC *et al.*, 2015). En neumonías severas se suele utilizar la vía inhalatoria combinada con la terapia intravenosa (Dijkmans AC *et al.*, 2015). La administración oral de colistina se utiliza en la descontaminación intestinal selectiva, mientras que el uso tópico se aplica en el tratamiento de infecciones oculares y otitis externas causadas principalmente por *P. aeruginosa* (Dijkmans AC *et al.*, 2015). También ha sido descrito su uso vía intravesical o intratecal para el tratamiento de infecciones del tracto urinario o meningitis causadas mayoritariamente por *Acinetobacter baumannii* (Loho T *et al.*, 2015).

3.5.2 Medicina veterinaria

En veterinaria la colistina se ha usado considerablemente durante décadas, principalmente en el tratamiento y prevención de diarreas en ganado porcino, aunque también en pollos y terneros (EMA, 2013). Actualmente en Europa, la colistina es ampliamente utilizada en medicina veterinaria (Catry B *et al.*, 2015). En animales de producción se administra fundamentalmente vía oral en el pienso o en el agua para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias en conejos, cerdos, pollos, terneros, ovejas, cabras, gallinas ponedoras y rumiantes de producción lechera (figura 10) (Catry B *et al.*, 2015). Su uso también está permitido en la prevención y tratamiento de colibacilosis neonatal en terneros a través de la administración de pastillas (Catry B *et al.*, 2015). La vía parenteral e intramamaria se reservan principalmente para el tratamiento de infecciones y endotoxemia en rumiantes. En acuicultura también se usa en la prevención de infecciones por bacterias Gram negativas (EMA, 2013). Fuera de la Unión Europea la colistina es un antibiótico que se utiliza también como promotor del crecimiento, aunque en algunos países como China ya se están promoviendo acciones para prohibir su uso como promotor (Rhouma M *et al.*, 2016b; Wang Y *et al.*, 2017).

En animales de compañía la colistina puede utilizarse inyectable o en gotas de oídos y ojos, tanto sola como en combinación con otros antimicrobianos. Sin embargo, su uso es mucho menos frecuente que en animales de producción (Catry B *et al.*, 2015).

Actualmente, una de las mayores preocupaciones que existe a nivel mundial se centra en el reservorio de resistencia a colistina mediada por plásmidos que suponen los animales de producción, a raíz de su uso indiscriminado, y en cómo repercute negativamente este reservorio en la salud pública (Rhouma M *et al.*, 2016a ; Al-Tawfiq JA *et al.*, 2017).

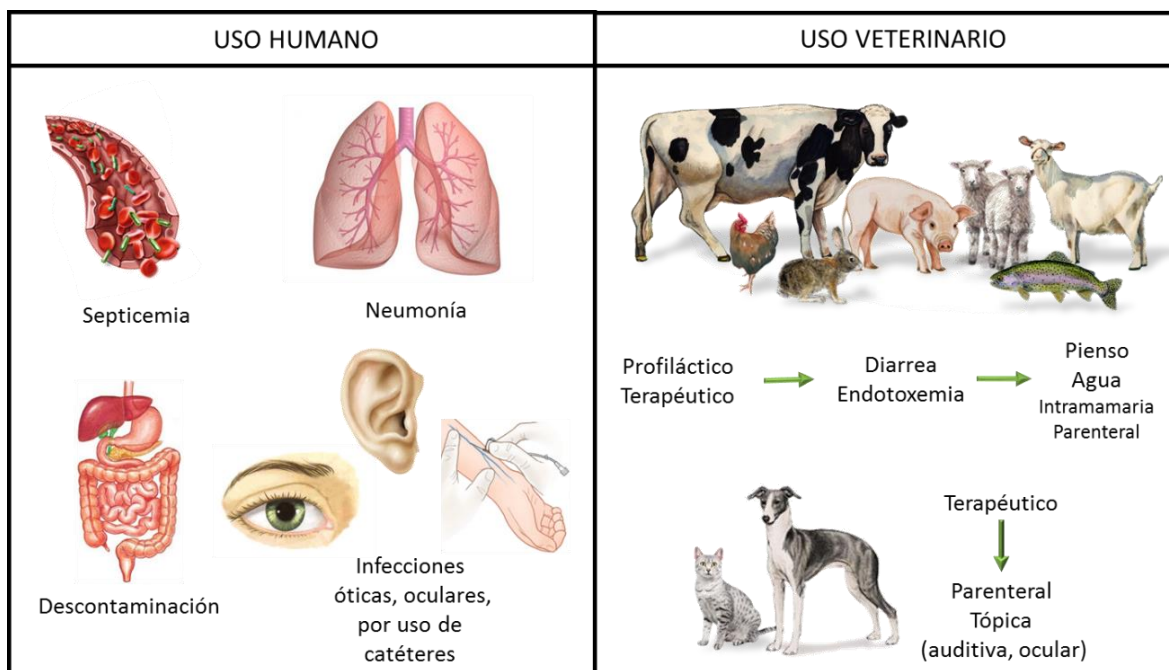


Figura 10. Principales usos de la colistina en medicina humana y veterinaria.

4.6 Mecanismos de resistencia a colistina

Como hemos visto anteriormente, la colistina para ejercer su acción necesita interactuar con el lípido A de los lipopolisacáridos (LPS). El mecanismo más común de resistencia a colistina (como al resto de polimixinas) consiste en la modificación de su diana de acción, a través de la modificación post-transcripcional de los LPS de la membrana exterior, lo que induce una reducción en la carga negativa de los residuos de fosfato del lípido A, impidiéndose la interacción de la colistina con el LPS y con ello su efecto bactericida (Jeannot K *et al.*, 2017). A parte se han descrito otros mecanismos menos relevantes que también contribuyen a la resistencia a polimixinas, como por ejemplo la sobreexpresión de bombas de eflujo, la modificación de las porinas de la membrana externa, la formación capsular mediante la sobreproducción de polisacáridos capsulares o la hipervesiculación (Bialvaei AZ *et al.*, 2015; Trimble MJ *et al.*, 2016). Todos estos mecanismos son cromosómicos, por lo que su transmisión es exclusivamente vertical. Asimismo presentan una lenta evolución y un alto *fitness cost*, lo cual ha favorecido que los niveles de resistencia a colistina se mantuviesen bajos en todo el mundo (Olaitan AO *et al.*, 2014; Lee JY *et al.*, 2016; Loho T *et al.*, 2015; Jeannot K *et al.*, 2017; Al-Tawfiq JA *et al.*, 2017). Sin embargo, recientemente se ha descubierto el primer gen de resistencia a colistina capaz de transmitirse horizontalmente, *mcr-1*, el cual se ha convertido en la principal causa de resistencia a colistina en enterobacterias como *E. coli*, *K. pneumoniae* o *Salmonella*

enterica, agravando la situación de la resistencia a colistina a nivel mundial (Liu YY *et al.*, 2016; Jeannot K *et al.*, 2017).

4.6.1. Modificación de los LPS

Los sistemas de dos componentes permiten la modificación de la estructura de los LPS cuando detectan condiciones de estrés para la bacteria, activando proteínas reguladoras que modulan la expresión de distintos genes diana, que finalmente modifican la estructura del LPS (Jeannot K *et al.*, 2017). En función de la especie bacteriana podemos encontrarnos diferencias con respecto a los genes que participan en esta cascada de modificación, pero en la mayoría de las bacterias los sistemas de dos componentes van a ser PmrA/PmrB y PhoP/PhoQ (Jeannot K *et al.*, 2017). De manera resumida, el funcionamiento sería el siguiente: PmrB y PhoQ son quinasas transmembranales citoplasmáticas que se activan al detectar cambios en el medio extracelular, como baja concentración de Mg^{2+} , Ca^{2+} , altas concentraciones de Fe^{3+} , Zn^{2+} , presencia de péptidos antimicrobianos catiónicos (polimixinas), pH bajo, etc. (Jeannot K *et al.*, 2017; Bialvaei AZ *et al.*, 2015; Trimble MJ *et al.*, 2016). Una vez activas, estas quinasas van a fosforilar a sus proteínas reguladoras PmrA o PhoP, activándolas (figura 11) (Jeannot K *et al.*, 2017). Estas proteínas a su vez van a activar la expresión de distintos genes que van a participar en la modificación del LPS a distintos niveles (Trimble MJ *et al.*, 2016). Los genes activados más comunes son 4-amino-4deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) que se va a unir al grupo fosfato del lípido A o la fosfoetanolamina (PEtN) que se une directamente al lípido A del LPS (Kaye KS *et al.*, 2016). Ambas modificaciones disminuyen la carga negativa neta del lípido A, impidiendo la unión de la polimixina. La resistencia a colistina se produce cuando existen mutaciones en los genes que regulan (*mgrB* en *K. pneumoniae*) o forman parte de estos sistemas de dos componentes, de tal manera que estos mecanismos de modificación de la estructura de los LPS están sobreexpresándose constitutivamente (Jeannot K *et al.*, 2017).

Como hemos mencionado, dentro de cada especie bacteriana este sistema va a tener sus peculiaridades, como por ejemplo sucede en *P. aeruginosa* donde además de los sistemas clásicos PmrA/PmrB y PhoP/PhoQ pueden intervenir otros sistemas de dos componentes, como ParR/ParS, CprR/CprS, y ColR/ColS (Trimble MJ *et al.*, 2016).

En *A. baumannii* solo se ha descrito el sistema PmrA/PmrB, que en vez de sintetizar L-Ara4N sintetiza galactosamina, que también se adicionará al lípido A (Jeannot K *et al.*, 2017). Igualmente, se ha observado un mecanismo único que aporta alto niveles de resistencia a polimixinas, que se basa en la pérdida completa del LPS por mutaciones en genes implicados en

la biosíntesis del lípido A (*lpxA*, *lpxC*, *lpxD*) o del núcleo del LPS (*lpsB*) (Jeannot K *et al.*, 2017; Kaye KS *et al.*, 2016).

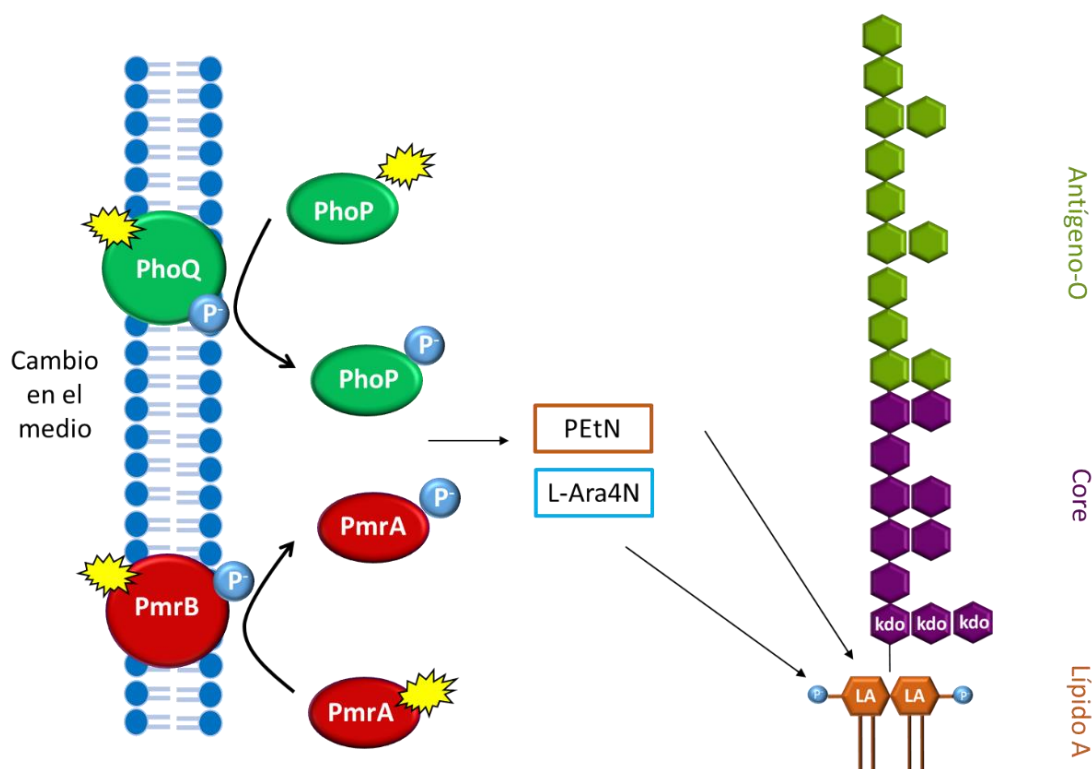


Figura 11. Representación de los principales genes implicados en el mecanismo de resistencia a colistina por modificación de la estructura de los LPS. El asterisco amarillo representa posibles mutaciones implicadas en la resistencia a colistina, que mantienen la expresión constitutiva del sistema. La activación de los sistemas PmrB/A y PhoQ/P activa la expresión de L-Ara4N y PetN, que se adicionan en el lípido A del LPS modificando su carga negativa neta. Kdo: ácido 3-desoxi- manooctulosónico. LA: lípido A. P: fosfato.

4.6.2. Resistencia a colistina mediada por plásmidos: genes *mcr*

Como hemos comentado a lo largo del capítulo, la colistina es un buen antibiótico de último recurso, pues es eficaz en el tratamiento de infecciones multirresistentes y los niveles de resistencia son bastante bajos (Gales AC *et al.*, 2011). Sin embargo, la aparición de genes de resistencia a polimixinas transferibles mediante plásmidos amenaza con acabar con esta herramienta, pues pese a ser un mecanismo recientemente identificado, se ha convertido en el más prevalente gracias a la facilidad de diseminación que presenta al estar codificada en un plásmido (Jeannot K *et al.*, 2017). Esta situación ha generado una alarma ante la preocupación de la pérdida de eficacia de la colistina como antibiótico de último recurso en el tratamiento de infecciones multirresistentes (Al-Tawfiq JA *et al.*, 2017).

El gen *mcr-1* (por sus siglas en inglés *plasmid-mediated colistin resistance*), fue identificado por primera vez en China en un plásmido IncI2 de gran tamaño (64105 pares de bases) con una alta tasa de transferencia y estabilidad, incluso en ausencia de antibióticos (Liu YY *et al.*, 2016). Su mayor prevalencia en animales, su frecuente asociación con ISApI1, elemento móvil originario de un patógeno animal (*Pasteurella multocida*), y el hecho de que la colistina se haya utilizado de manera masiva en animales de producción, estableció la teoría de que se originase primero en animales y se diseminara posteriormente a humanos (Liu YY *et al.*, 2016; Schwarz S *et al.*, 2016; Karaiskos I *et al.*, 2017). El análisis de los residuos localizados en el sitio catalítico de la proteína junto con modelos predictivos de la estructura de la proteína, determinaron que Mcr-1 tenía similitud estructural con las enzimas LptA y EptC de *Neisseria meningitidis* y *Campilobacter jejuni* respectivamente (Liu YY *et al.*, 2016; Jeannot K *et al.*, 2017). Estas enzimas con actividad fosfoetanolamina transferasa son capaces de adicionar una molécula de PEtN al ácido 3-desoxi-manooctulosónico del núcleo del LPS (figura 11) (Liu YY *et al.*, 2016; Jeannot K *et al.*, 2017). Por lo tanto, el mecanismo por el cual *mcr-1* confiere resistencia a polimixinas se basa en la adición de PEtN al lípido A, por lo que en esencia es igual que el mecanismo cromosómico de modificación de LPS explicado en el apartado anterior (Liu YY *et al.*, 2016).

Desde su descubrimiento en 2015 se han descrito aislados positivos a este gen así como a sus variantes *mcr-2* (76,75% identidad en nucleótidos con *mcr-1*) y *mcr-1.2* (sustitución aminoacídica Q3L con respecto a *mcr-1*) a lo largo de todo el mundo, procedentes tanto de cepas clínicas humanas como de animales, alimentos y medio ambiente (figura 12) (Di Pilato V *et al.*, 2016; Xavier BB *et al.*, 2016; Jeannot K *et al.*, 2017).

Por el momento, *mcr-1* y sus variantes solo han sido descritos en enterobacterias, principalmente en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Salmonella* spp., donde el nivel de resistencia que confieren, en general, es menor que el producido por mutaciones cromosómicas (Liu YY *et al.*, 2016; Jeannot K *et al.*, 2017). La movilización de *mcr-1* se asocia a la secuencia de inserción ISApI1, aunque la presencia de este elemento móvil en los plásmidos que contienen *mcr-1* es variable (Karaiskos I *et al.*, 2017). Aunque se describió por primera vez en cepas aisladas durante

los años 2011-2014, el estudio retrospectivo de su prevalencia ha detectado la presencia de este gen en aislados más antiguos de incluso 1980 (Schwarz S *et al.*, 2016; Liu YY *et al.*, 2016).

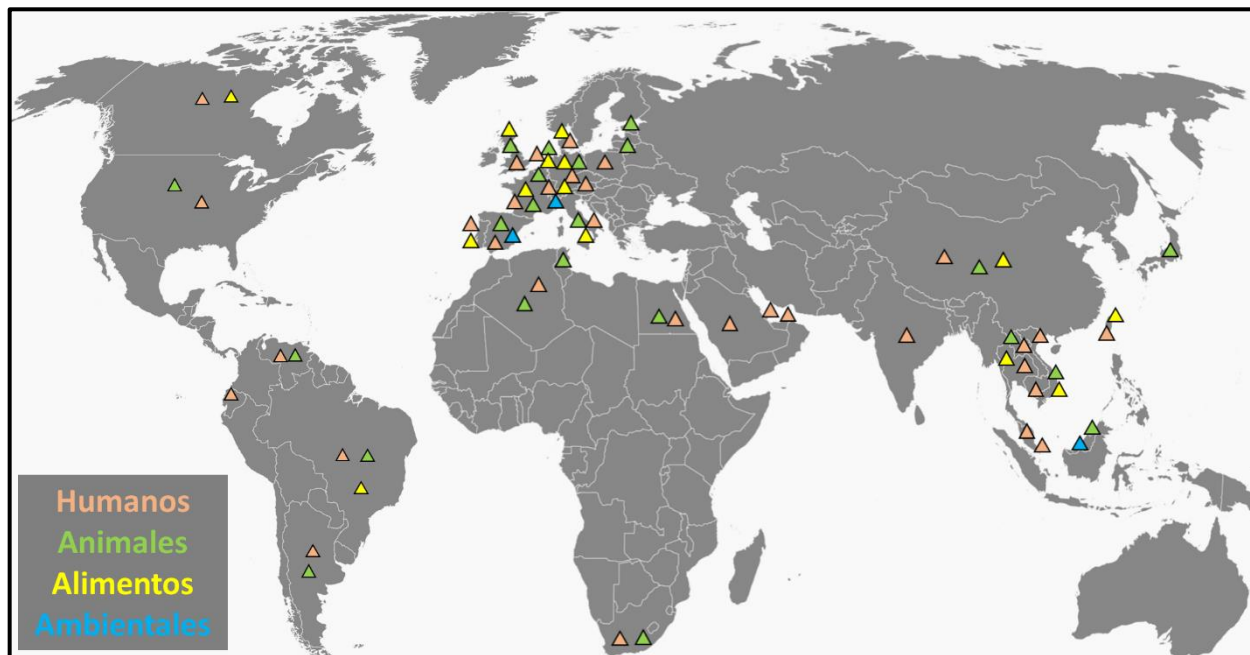


Figura 12. Distribución mundial de *mcr-1* procedente de aislados humanos, ambientales, de alimentos y de animales de producción. (Carnevali C *et al.*, 2016; Ovejero CM *et al.*, 2017; Jeannot K *et al.*, 2017; Sonnevend Á *et al.*, 2016; Do Monte DF *et al.*, 2017; Hartl R *et al.*, 2017; Meinersmann RJ *et al.*, 2017; El Garch F *et al.*, 2017; Mohsin M *et al.*, 2016; Yanat B *et al.*, 2016; Meinersmann RJ *et al.*, 2016; Brauer A *et al.*, 2016; Rolain JM *et al.*, 2016; Ortega-Paredes D *et al.*, 2016; Liassine N *et al.*, 2016).

Las dos características de los genes *mcr* que más preocupan son su localización en plásmidos transferibles, que fácilmente pueden diseminarse por conjugación entre distintas especies bacterianas, y su frecuente co-localización con otros genes de resistencia de importancia clínica, como *blaCTX-M*, *blaNDM*, *blaKPC*, *blaOXA-48*, etc. (Jeannot K *et al.*, 2017; Karaikos I *et al.*, 2017). *mcr-1* ha sido localizado en plásmidos con distintos grupos de incompatibilidad como IncI2, IncX4, IncHI2, IncP o IncF (Karaikos I *et al.*, 2017). En general, estos plásmidos se encuentran muy diseminados entre enterobacterias tanto de animales como de humanos y frecuentemente asociados a betalactamasas de espectro ampliado, genes de resistencia a quinolonas o carbapenemasas (Day MJ *et al.*, 2016; Zurfluh K *et al.*, 2015; Zurfluh K *et al.*, 2014).



OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

Imagen: El gerente de la farmacia de Whalen, Dave Tarlow, colgando un cartel en el cual publicitan el hecho de que ya pueden vender penicilina y la tienen en stock. Nueva York, 1945.

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

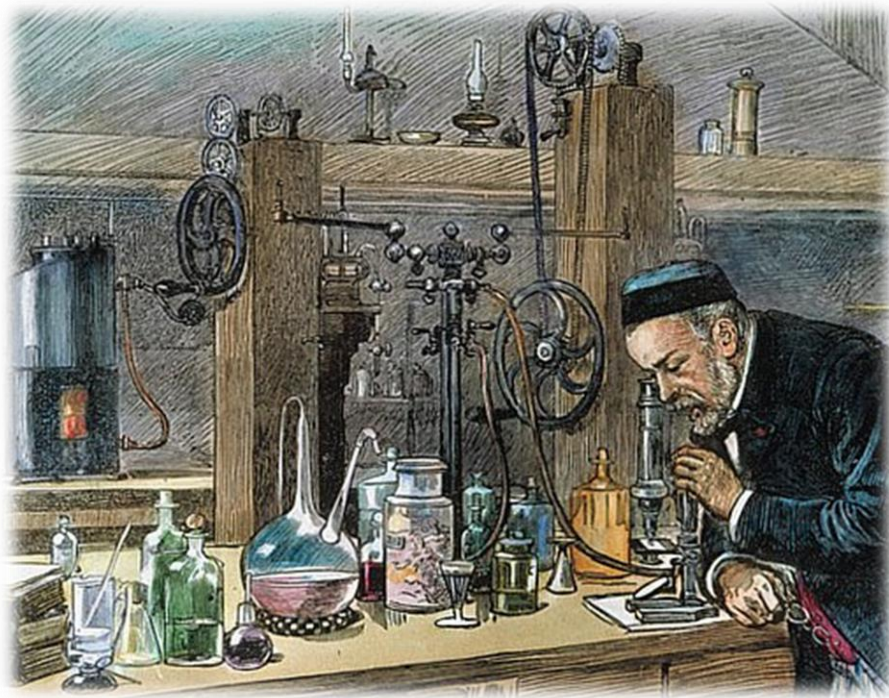
La resistencia a antibióticos se ha convertido en una de las mayores preocupaciones de la salud pública del siglo XXI, pues paulatinamente nos acerca a la era post-antibiótica en la cual, no solo el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes no será posible ante la falta de antibióticos efectivos, si no que todos los avances logrados por la medicina y cirugía moderna se verán amenazados. Uno de los factores que interviene en la acentuación de dicha preocupación es la escasez en el desarrollo y puesta en el mercado de nuevos antibióticos, lo cual obliga a preservar los antibióticos que actualmente tenemos disponibles, especialmente aquellos con gran poder bactericida incluso contra microorganismos multirresistentes como las carbapenemas, la tigeciclina o la colistina, por lo que se consideran antibióticos de último recurso.

Las enterobacterias son una familia de bacterias Gram negativas responsables de gran parte de las infecciones nosocomiales que se producen a nivel mundial. Desafortunadamente, la asociación de estas bacterias junto con mecanismos de resistencia frente a antibióticos de último recurso está en aumento. Sin embargo estas bacterias no solo habitan en ambientes hospitalarios, si no que podemos encontrárnoslas como comensales del ser humano, de los animales e incluso en el medio ambiente. Este hecho favorece que las resistencias que se seleccionan y evolucionan en uno de estos ambientes sean capaz de propagarse hacia el resto fácilmente.

Por todo ello el objetivo de esta tesis doctoral es la identificación y caracterización de enterobacterias resistentes a antibióticos de importancia clínica, aisladas de animales de compañía, del medio ambiente y de pacientes hospitalizados. El estudio epidemiológico-molecular del origen y diseminación de estas bacterias en sus respectivos medios, junto con el análisis de las plataformas genéticas involucradas en la transmisión de las resistencias, nos dará información sobre su potencial de diseminación hacia otros nichos y su tendencia evolutiva. De esta forma alcanzaremos un mayor conocimiento sobre el papel que juegan los animales de compañía y el medio ambiente en la resistencia a antimicrobianos y evaluaremos su repercusión en la salud humana. Así mismo, el estudio evolutivo de patógenos multirresistentes a nivel intrahospitalario nos permitirá identificar la presencia y emergencia de clones epidémicos de

alto riesgo y de sus plataformas genéticas, con el fin de interrelacionarlos para facilitar su detección y frenar su propagación.

Con todos estos resultados podrán desarrollarse acciones y tomarse medidas para frenar el avance anómalo de las resistencias y conseguir más tiempo para la búsqueda de nuevos antibióticos.



RESULTADOS

Imagen: Louis Pasteur en su laboratorio. Grabado de 1880 en color.

RESULTADOS

Esta tesis doctoral se compone de tres trabajos en los que se estudian y caracterizan las resistencias antimicrobianas en los ambientes humano, animal y ambiental respectivamente. Por ello y con el fin de facilitar su lectura y comprensión, los resultados se presentan divididos en tres capítulos, cada uno de los cuales hace referencia al trabajo realizado en cada uno de estos tres ámbitos. Dos de estos trabajos han sido recientemente publicados en revistas especializadas de reconocido prestigio internacional (anexo 1).

CAPÍTULO I

***Klebsiella pneumoniae* ST11 and ST147 highly resistant
to tigecycline from companion animals**

ABSTRACT

Resistance to tigecycline is infrequent, and has been limited and restricted to bacteria isolated from human samples. In this study we have identified two *Klebsiella pneumoniae* isolates, BB1286 and BB1287, collected from urine samples from dogs. The isolates showed a multiresistant profile with an unexpected high-level resistance to tigecycline (MIC > 4 mg/L). PFGE analysis revealed that both isolates were not genetically related, which was supported by MLST typing results that revealed that BB1286 belonged to ST11 and BB1287 to ST147, both sequence types classically related to hospitals. To the best of our knowledge this is the first identification of tigecycline resistance in bacteria isolated from animals, revealing worrying and new ways of spread for bacteria resistant to these last resort antibiotic. We propose that companion animals should be included in routine surveillance programs, in order to identify their contribution as reservoirs for human health.

INTRODUCTION

The presence of resistant bacteria in animals is a concern for public health, since animals act as a reservoir of resistance genes facilitating their maintenance, evolution and spread (Labro MT *et al.*, 2014). In this regard, food-producing animals have been more studied than companion animals (Labro MT *et al.*, 2014). Nevertheless, the close contact between pets and human beings and the fact that the same antibiotics are used to treat infectious diseases in both, have recently been of interest (Labro MT *et al.*, 2014; Rubin JE *et al.*, 2014). The incidence of Gram negative resistant bacteria on companion animals is increasing, even the occurrence of carbapenemase-producing bacteria has been already reported (Abraham S *et al.*, 2014).

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogen that can cause community-acquired bacterial pneumonia in immunosuppressed patients such as diabetics or alcoholics. However, this organism is most known for being one of the main pathogens that produce nosocomial bacterial infections, especially in patients undergoing prolonged hospitalization (Podschun R *et al.*, 1998; Montgomerie JZ, 1979). *K. pneumoniae* belongs to the “ESKAPE” pathogens, a term which includes the organisms that currently cause a large number of hospital infections and which efficiently “escape” the effects of antimicrobial drugs (Boucher HW *et al.*, 2009; Rice LB *et al.*, 2008).

Since the emergence of extended-spectrum betalactamase-producing organisms in the late 1990s, the treatment of infections caused by these bacteria has been compromised. Nowadays *K. pneumoniae* along with *E. coli* are the main ESBL-producing bacteria. The treatment options to avoid therapeutic failure and to correctly control these infections are scarce, being carbapenems the treatment of choice (Pitout JDD *et al.*, 2008; Paterson DL *et al.*, 2005). Nevertheless, the therapeutics options are dramatically decreased with the emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* (Munoz-Price LS *et al.*, 2013). Taking into account that this resistance is commonly associated with fluoroquinolone or aminoglycoside resistance, antibiotic therapy is limited to a few choices: older antibiotics such as colistin or newer ones such as tigecycline (Canton R *et al.*, 2008; Falagas ME *et al.*, 2009).

Tigecycline is the first member of a new tetracycline class, the glycylcyclines. It is a semisynthetic derivative of minocycline, which is active against many species of drug-resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria, anaerobes and ‘atypical’ bacteria (Peterson LR, 2008). Due to its effectiveness against multi-drug resistant pathogens, the US Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA) establish that tigecycline should

be restricted to the treatment of complicated skin and skin structure infections, complicated intra-abdominal infections and community-acquired bacterial pneumonia, only when other antibiotics are not suitable (Peterson LR, 2008; Sun Y *et al.*, 2013; Stein GE *et al.*, 2013; Livermore DM, 2005).

Since the first report in 2007, tigecycline resistance has increased, mainly among Gram-negative bacteria. *Acinetobacter baumannii* is the most frequently isolated tigecycline resistant bacterium, closely followed by *K. pneumoniae*. The appearance of tigecycline resistant isolates is related to tigecycline use during the treatment of hospitalized patients (Sun Y *et al.*, 2013). Previous studies have shown that tigecycline resistance in *K. pneumoniae* results from the overexpression of AcrAB-TolC, a multisubstrate efflux pump belonging to the resistance-nodulation-division (RND) superfamily (Sun Y *et al.*, 2013; Hentschke M *et al.*, 2010; Ruzin A *et al.*, 2005; Ruzin A *et al.*, 2008). The expression of this efflux pump is controlled by transcriptional regulators such as *acrR*, *ramA* (Ruzin A *et al.*, 2005; Li XZ *et al.*, 2009; Bailey AM *et al.*, 2008) or the lately described *rara* (Veleba M *et al.*, 2012a; Veleba M *et al.*, 2012b; De Majumdar S *et al.*, 2013). Hence, mutations that caused alterations in the expression levels of these regulatory proteins can induce the upregulation of AcrAB-TolC, and thus resistance to tigecycline.

In the present study we characterized two *Klebsiella* isolates from companion animals showing high-level tigecycline resistance. Our results show the involvement of an efflux pump other than the well characterized AcrAB and AcrEF in this phenotype. We could confirm that the resistance mechanism is chromosomal in one of the isolates.

MATERIALS AND METHODS

Strains, culture conditions and susceptibility tests

Clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* resistant to tigecycline, BB1286 and BB1287, were isolated from two dog urine samples in the Hospital Clínico Veterinario Complutense, Madrid, Spain. Two strains were included in our study as a control, *K. pneumoniae* ATCC 10300 and *K. pneumoniae* BB1097 (clinical isolate sensitive to tigecycline that was isolated in the same Hospital in the same period). *K. pneumoniae* strains were cultured on both Brain Heart Infusion agar plates and broth. Culture media was obtained from Oxoid (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) and bioMérieux (France). Chemicals, additives, and antibiotics were supplied by Oxoid (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) and Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo). Antibioqram susceptibility tests were performed using the disk diffusion method according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI, 2013). The Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) were determined by broth microdilution in commercial microtiter plates (Sensititre EUMVS2; Trek Diagnostics, Inc., Westlake, OH) except in the case of tigecycline, neomycin, aztreonam, ampicillin, rifampicin, minocycline and erythromycin, for which susceptibility was measured using in-house microtiter plates as CLSI guidelines recommend. To determine the possible involvement of an efflux pump in tigecycline resistance, MICs in the presence and absence of the efflux pump inhibitor PABN 75 nM (phenyl-arginine- β -naphthylamide dihydrochloride, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) were determined again using E-test (bioMérieux, France).

DNA analysis and manipulation, electroporation, and conjugation experiments

Primers used in this study were supplied by Sigma-Genosys (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). A list of the primers used can be found in table 4. Taq (Biotools, B&M Labs, Spain) and Phusion polymerase (Finnzymes, Woburn, MA) were used to perform PCRs. PCR products were purified using a Qiagen PCR purification kit, or gel extraction kit (Qiagen Inc., Chatswoth, CA.) Plasmid DNA extractions were performed using a plasmid midikit and a QIAprep spin miniprep kit (Qiagen Inc., Chatswoth, CA.). Plasmid Automated sequencing was undertaken by Secugen S. L. (Madrid, Spain). Plasmids were transformed in INV Φ F' and ATCC 10300 by electroporation using the following parameters: 2.5 kV/cm, 25 μ F, and 200 Ω . Transformants were selected on BHI agar plates containing ampicillin (50 μ g/ml). Plasmid conjugation was performed using BB1286 and BB1287 as the donors and BB1076 (lacIq rrnBT14 DlacZWJ16 hsdR514 DaraBADAH33 DrhaBADLD78) as the recipient; the strains were grown until the donor

reached an optical density at 600 nm of 0.9. Then, 1 ml of the donor culture, 1 ml of the recipient culture, and 1 ml of fresh BHI broth were mixed in and incubated for 3 h at 37°C without shaking. Transconjugants were selected on BHI agar plates containing amikacin (150 µg/ml) and ampicillin (50 µg/ml). To determine plasmid size of wild type strains and to assess which plasmid were transformed or conjugated, S1 pulsed-field gel electrophoresis (S1- PFGE) were carried out as described previously (Granier SA *et al.*, 2011). Plasmid replicon typing to determine the plasmid incompatibility group was carried out for transformants and transconjugants (Carattoli A, 2005).

Molecular typing

K. pneumoniae strains were subjected to pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis. Briefly, the whole-cell DNA of the isolates was extracted and digested with XbaI over-night at 37°C. Electrophoresis was carried out with a CHEF DRIII (Bio-Rad) through a 1% agarose gel in 0.5 x Tris-borate-EDTA buffer at 14°C, a voltage of 6 V/cm and a switch angle of 120°, using pulse times ranging from 2.2 to 63.8 s for 19 h. Lambda ladder PFGE marker (New England Biolabs, Ipswich, MA) was used as DNA molecular weight marker. Multilocus sequence typing (MLST) of *K. pneumoniae* was performed using seven conserved housekeeping genes (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, and *tonB*) according to protocols available at the MLST Pasteur website (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Sequences were compared with those on the MLST web and alleles and sequence types (STs) were assigned accordingly.

RNA preparation

Cells of *K. pneumoniae* were harvested during the exponential phase of growth (optical density at 600 nm = 0,3). Total cellular RNA was isolated from cell using the RNeasy kit (Quiagen, Inc., Chatsworth, CA) according to the manufacturer's protocol. A conventional PCR was performed to confirm the absence of DNA prior to retrotranscription. Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 6-bp random primers were used for the cDNA synthesis. The presence of cDNA was verified through PCR.

qRT-PCR

Quantitative real time reverse transcription-PCR was carried out to assess the expression levels of *acrA* and *acrF* genes. Primers were designed using AlleleID 7.7 software (Premier Biosoft, Palo Alto, CA) (Table 4). *rpoB* was used as a control gene to normalize cDNA levels. The tigecycline-sensitive strains ATCC 10300 and BB1097 were used as controls. qRT-PCR was performed (three biological replicates, three technical replicates of each) using a MyiQ

thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Spain). No primer-dimer or mispriming was obtained in any of the PCRs. The amplification efficiency of all assays was $100\% \pm 5\%$. Expression levels were normalized against levels of *rpoB* expression, and these data were calibrated against expression levels of the sensitive strains as the baseline to determine fold changes in expression.

Tabla 4. List of primers used in this study.

| Primer | Sequence 5'→3' | Reference |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Amplification and sequencing | | |
| acrRAB -28-9 | AAAAATTCACGCCCATCCGC | This work |
| acrRAB 710-691 | GCTATGGTACATACATTAC | This work |
| acrRAB 1072-1091 | TGTATCAGATCGATCCAGCC | This work |
| acrRAB 1194-1175 | CCAACAGTTTCTGATAACGC | This work |
| acrRAB 2181-2200 | GCAGAACACCGTAACTCAGG | This work |
| acrRAB 2307-2288 | ATCGGTACCGGATTCGAAGG | This work |
| acrRAB 3311-3330 | ATCGATGGGACAGATTCAGG | This work |
| acrRAB 3441-3422 | CGCGGAAACGATAGTGATGG | This work |
| acrRAB 4472-4491 | TCTGCCGTCCTGGAAATCC | This work |
| acrRAB 4609-4590 | CGCTCCTGATAAGACATCCC | This work |
| acrRAB 4902-4921 | CTTGAAGCAGTACGTATGCG | This work |
| acrRAB 5187-5168 | GTAGCGGCCTTTTGTTTCAGG | This work |
| ramA F | GGATGAACCGTATCAACG | This work |
| ramA R | CCATTGAGTATCTGGTGC | This work |
| ramR F | TGCCCCGGTGAACCTGGCGT | (Hentschke M <i>et al.</i> , 2010) |
| ramR R | ATTTGCTGATTACGACGCGAC | (Hentschke M <i>et al.</i> , 2010) |
| marRA F | ATAAAGAGTGACCCACATCG | This work |
| marRA R | TGCGGCAGCGAATAGTTTCA | This work |
| soxSR F | ATGCAGTGGTTAGCCAATGC | This work |
| soxSR R | TAGTGAGGAAAAAGCGACGG | This work |
| qRT-PCR | | |
| acrA F | GGCAAACATGGATCAACTG | This work |
| acrA R | GGCGGTATCGTAGTCTTG | This work |
| acrF F | CCCATTTGACGGTGAAAC | This work |
| acrF R | ACTGCCTGATCGTATTCC | This work |
| rpoB F | ATATGGCTTCCTTGAGAC | This work |
| rpoB R | GATAGCAGACAGGTACTG | This work |
| Resistant determinants | | |
| CTX-M universal F | CGATGTGCAGTACCACTAA | (Batchelor M <i>et al.</i> , 2005) |
| CTX-M universal R | TTAGTGACCAGAATCAGCGG | (Batchelor M <i>et al.</i> , 2005) |
| MulticaseCIT_for | CGAAGAGGCAATGACCAGAC | (Dallenne C <i>et al.</i> , 2010) |
| MulticaseCIT_rev | ACGGACAGGGTTAGGATAGY ^b | (Dallenne C <i>et al.</i> , 2010) |
| TetA-F | GTAATTCTGAGCACTGTCGC | (Saenz Y <i>et al.</i> , 2004) |
| TetA-R | CTGCCTGGACAACATTGCTT | (Saenz Y <i>et al.</i> , 2004) |
| TetB-F | ACGTTACTCGATGCCAT | (Moleres J <i>et al.</i> , 2015) |
| TetB-R | AGCACTTGTCTCCTGTT | (Moleres J <i>et al.</i> , 2015) |
| TetC-F | TCTAACAAATGCGCTCATCGT | (Saenz Y <i>et al.</i> , 2004) |
| TetC-R | GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC | (Saenz Y <i>et al.</i> , 2004) |

Y^b= T or C,

RESULTS

Strain identification and molecular characterization

In July 2010, two *Klebsiella pneumoniae* strains (BB1286 and BB1287) were isolated from two different dog urine samples in the Hospital Clínico Veterinario Complutense. A complete antibiogram profile showed a multiresistant phenotype (table 5) and an unexpected high-level resistance to tigecycline (MIC > 4 mg/L). PFGE of both strains showed that the two *K. pneumoniae* were not genetically related. This result was further confirmed by MLST analysis, which showed that BB1286 belonged to the hyper-epidemic successful clone ST11 (allelic profile: *gapA*, 3; *infB*, 3; *mdh*, 1; *pgi*, 1; *phoE*, 1; *rpoB*, 1; and *tonB*, 4) and BB1287 was to ST147, a more recently ST (allelic profile: *gapA*, 3; *infB*, 4; *mdh*, 6; *pgi*, 1; *phoE*, 7; *rpoB*, 4; and *tonB*, 38) (Figure 13). Both sequence types are related with human clones (Andrade LN *et al.*, 2011; Andrade LN *et al.*, 2014; Kocsis B *et al.*, 2013; Rodrigues C *et al.*, 2014).

Tabla 5. MIC of strains from this study against several antibiotics.

| | MIC (mg/L) | | | | | |
|--------------------------|------------|--------|---------|----------|---------|----------|
| | BB1286 | BB1287 | INVaF' | BB1287tf | BB1076 | BB1287tc |
| Sulfamethoxazole | > 1024 | > 1024 | <8 | > 1024 | <8 | > 1024 |
| Gentamicin | 0.5 | 32 | 1 | 32 | > 32 | > 32 |
| Ampicillin | 128 | 512 | 4 | 256 | 8 | 256 |
| Cefotaxime | 0.12 | 4 | 0.25 | > 4 | 0.12 | 4 |
| Ceftazidime | 0.5 | 16 | 0.5 | > 16 | <0.25 | 16 |
| Tetraciclina | > 64 | > 64 | <1 | 32 | <1 | 64 |
| Streptomycin | 16 | > 128 | > 128 | > 128 | 8 | > 128 |
| Chloramphenicol | > 64 | > 64 | <2 | 64 | 4 | > 64 |
| Florfenicol | 32 | 64 | <2 | 16 | 4 | 32 |
| Kanamycin | > 128 | > 128 | <4 | > 128 | > 128 | > 128 |
| Ciprofloxacin | > 8 | > 8 | < 0.008 | < 0.008 | 0.03 | 0.03 |
| Nalidixic Acid | > 64 | > 64 | < 4 | < 4 | < 4 | < 4 |
| Trimethoprim | 32 | 2 | < 0.5 | < 0.5 | < 0.5 | < 0.5 |
| Colistin | < 2 | < 2 | < 2 | < 2 | < 2 | < 2 |
| Aztreonam ^a | 0.25 | 8 | 0.25 | 8 | < 0.125 | 8 |
| Imipenem ^a | 0.5 | 0.5 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.5 |
| Tigecycline ^a | 6 | 4 | < 0.025 | < 0.025 | < 0.025 | < 0.025 |
| Tigecycline-PABN (75nM) | 1.5 | 0.25 | - | - | - | - |

^a In house microtiter plates

90

transconjugant BB1287tc. Antibiotic susceptibility of BB1287tf and BB1287tc showed the transfer *en bloc* of resistance to sulfamethoxazole, gentamicin, ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, tetracycline, streptomycin, chloramphenicol, florfenicol, kanamycin and aztreonam (table 5). The conjugative plasmid was classified according to a PCR-based replicon typing protocol (Carattoli A, 2005) as belonging to the IncA/C incompatibility group, which is widely distributed among human and animal *Enterobacteriaceae* (Johnson TJ *et al.*, 2012; Carattoli A, 2013).

In order to characterize the plasmid-borne antibiotic resistance determinants, wild-type, transformant and transconjugant strains were screened by conventional PCR for the main beta-lactamases, fluoroquinolone and tetracycline resistance genes, and sequenced using primers listed in table 4. The wild-type BB1286 harboured the non-ESBL *bla*SHV-11, *tetA* and *qnrB4* genes whereas BB1287 carried, besides the non-ESBL *bla*SHV-11 and the *tetA* gene, the non-ESBLs *bla*CMY-2. BB1287tf and BB1287tc only harboured *bla*CMY-2 and *tetA* genes.

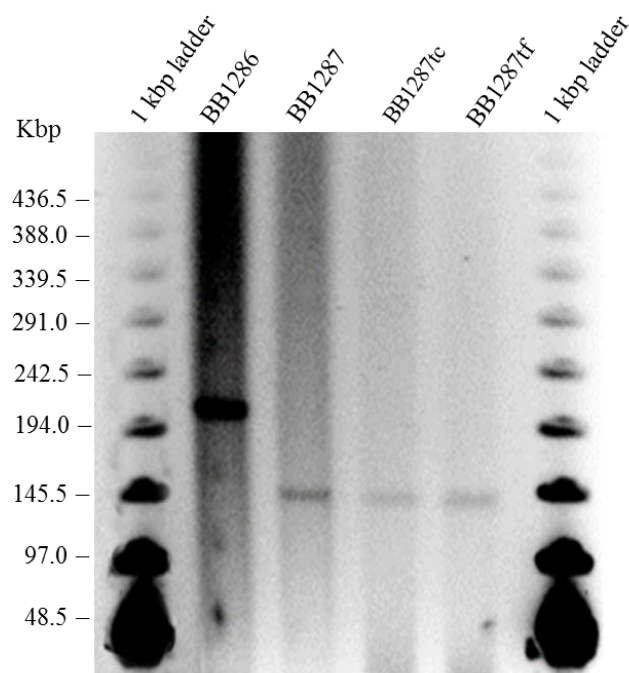


Figura 14. PFGE of S1 nuclease digestion. Total DNA from the WT strains (BB1286 and BB1287) and the transformant and transconjugant of BB1287.

Tigecycline resistance is mediated by an efflux mechanism

In order to assess the involvement of efflux pumps in the tigecycline resistance phenotype, MICs with and without the efflux inhibitor PA β N were performed. Both BB1286 and

BB1287 had a four- and a sixteen-fold decrease in tigecycline resistance respectively in the presence of PA β N (table 5). This reduction was indicative of tigecycline efflux in these strains.

Tigecycline resistance is not produced by AcrAB efflux pump

In *K. pneumoniae*, resistance to tigecycline has been always associated with the overexpression *acrAB*, an operon encoding two of the three genes of the AcrAB-TolC multi-drug resistance transporter of the Resistance-Nodulation-Division (RND) Superfamily (Li XZ *et al.*, 2009). Mutations in the genes regulating AcrAB are responsible for the enhanced expression of the operon, leading to the resistance phenotype. To assess the role of this system in tigecycline resistance in our isolates, qRT-PCR was performed to determine the levels of expression of these pumps. Susceptible tigecycline strains, BB1097 and ATCC 10030, were used as controls. Expression levels of *acrA* were not significantly different between BB1286, BB1287 and the control strains (figure 15). Accordingly, no mutations potentially related to the resistance phenotype were identified in *acrAB*, nor in its regulome, *acrR*, *marA*, *marR* (*marA* repressor), *ramA*, *ramR* (*ramA* repressor), *soxS*, *soxR* (*soxS* repressor) when comparing tigecycline resistant isolates BB1286 and BB1287, and tigecycline susceptible clinical isolate BB1097. We therefore decided to study the expression of AcrEF, another RND efflux system known to transport tigecycline in *E. coli*. AcrEF shows high homology with AcrAB, with a 77% amino acid identity between the two transporters (Hirata T *et al.*, 2004). Expression levels of *acrF* were determined by qRT-PCR for BB1286, BB1287 and the control strains, BB1097 and ATCC 10030. *acrF* was very weakly expressed in all strains and, no significant differences were observed between resistant and sensitive strains (figure 15).

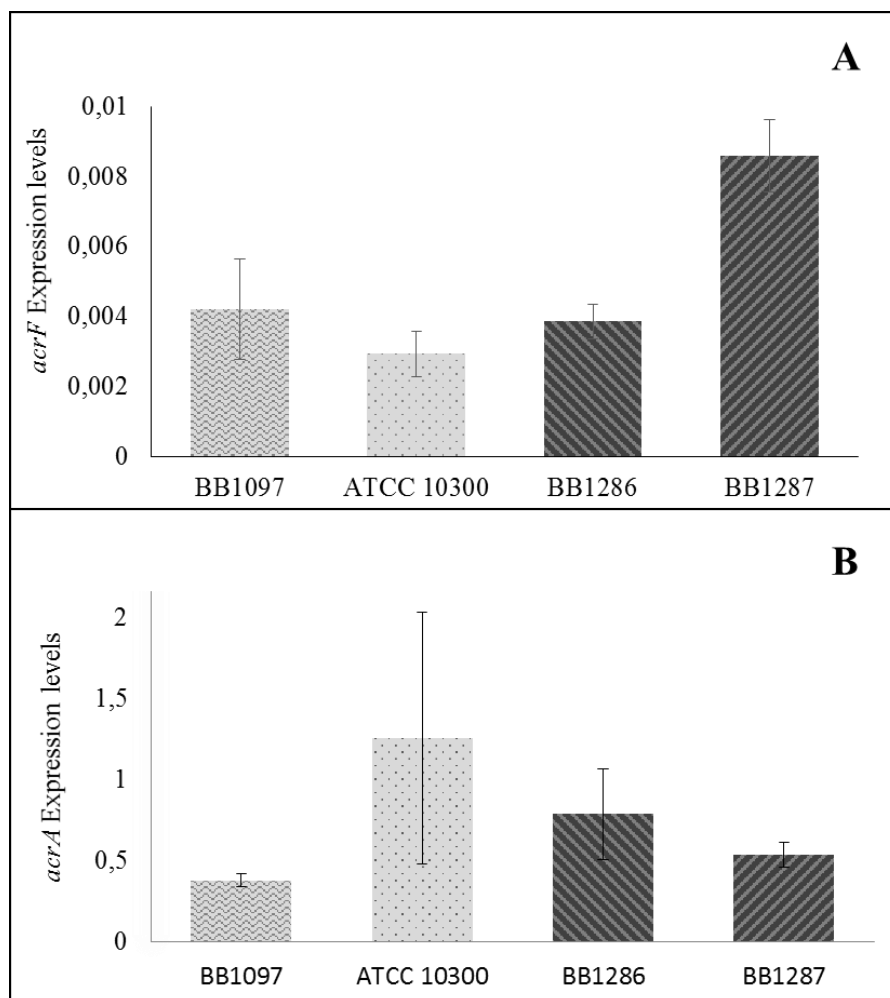


Figura 15. Expressions levels of efflux pumps, usually involve in tigecycline resistance in *K. pneumoniae*, determined by qRT-PCR. A: Levels of expression of *acrF*. B: Levels of expression of *acrA*. Pump expression was normalized against *rpoB* expression levels.

DISCUSSION

The increase of antimicrobial resistance is one of the main factors that endanger modern medicine. Tigecycline is one of the newest and most powerful antimicrobials available, and is used often as the last resource against insidious nosocomial infections for which all other antibiotic agents, including carbapenems, are not active. Thus, the use of tigecycline is restricted, and resistance in *K. pneumoniae* from pets was unexpected.

In this study we analyzed two *K. pneumoniae*, BB1286 and BB1287, isolated from companion animals, which showed high-level resistance to tigecycline and other antibiotics. To the best of our knowledge, this is the first identification of tigecycline resistant bacteria isolated from pets. Interestingly, MLST confirmed that BB1286 and BB1287 belong to human-related sequence types ST11 and ST147 respectively. ST11 is considered as an important hyper-epidemic nosocomial human clone distributed worldwide and associated to the dissemination of ESBLs, aminoglycoside resistance mediating 16S rRNA methylase genes as well as carbapenemases (Andrade LN *et al.*, 2014; Lascols C *et al.*, 2013; Hidalgo L *et al.*, 2013). It is the founder of a large clonal complex to which other STs clinically relevant belongs to, such as ST258 (figure 13) (Andrade LN *et al.*, 2011). Moreover, ST11 is emerging in animals, since its first detection in dogs (Hidalgo L *et al.*, 2013) it has been identified in other companion animals (Donati V *et al.*, 2014; Wohlwend N *et al.*, 2015) and recently in wild animals (Pilo P *et al.*, 2015; Loncaric I *et al.*, 2016). On the contrary, ST147 is a newer and emergent human-related sequence type as shown in figure 13, associated with multidrug and even extensive resistant human isolates but not found in animals (Lascols C *et al.*, 2013; Guo L *et al.*, 2016; Galani I *et al.*, 2016).

It is widely known that the use of antibiotics in food-producing animals, both as therapeutic agents and growth promoters, contributes to the selection of resistant strains, thus food animals may act as reservoirs of resistant determinants which can be transmitted to human directly or indirectly through food chain or animal waste release to the environment (Marshall BM *et al.*, 2011). For this reason many experts have strived hard to establish global policies aiming to restrict antimicrobial use in food-producing animals. Nevertheless the use of antibiotics in cats and dogs is not as regulated as in food animals, where the use is boundless despite the fact that they are treated with the same antibiotics than humans, being our contact with pets very close (Guardabassi L *et al.*, 2004; Lloyd DH, 2007). Our finding is highly relevant for several reasons. Firstly, it shows the adaptation of successful human clones to animals, increasing the spread of this important resistance and threatening to eliminate one of the last

therapeutic options for complicated infections in humans. Secondly, these results are clear evidence of the transmission of resistant bacteria between pets and human beings. In this regards, as the control of the prudent use of antibiotics in small animal practice is difficult to carry out, it is important that each veterinarian tries to minimize the development of resistances, undertaking a correct antibiotic use, with the purpose of preserving last-line antimicrobials effectiveness in human medicine.

Here, we show that the main mechanism of resistance to tigecycline in BB1286 and BB1287 is through an efflux pump. Furthermore, we suggest that this efflux pump may be encoded in the chromosome, since the transformation and conjugation experiments did not reveal a plasmid-mediated mechanism. We assessed the involvement of AcrAB, the main tigecycline efflux pump in *K. pneumoniae*. Likewise, we evaluated the participation of AcrEF, an efflux pump that is highly homologous to AcrAB system and in *E. coli* is associated with tigecycline resistance. Interestingly, our results point out that neither AcrAB nor AcrEF were responsible for tigecycline resistance in our isolates, suggesting the involvement of a novel resistance mechanism. Further experiments are needed to elucidate the genetic basis of this mechanism.

CAPÍTULO II

Whole genome sequencing reveals the dissemination of high risk clones and the evolution of their multidrug resistance plasmids in an Indian Hospital

ABSTRACT

16S rRNA methyltransferases (ArmA, RmtA-H, NpmA), which provide high levels of resistance to all clinic-used aminoglycosides, are usually associated with other resistance genes in plasmids. The goal of this work was to study the role of bacteria and plasmids linked to these methylases, in extensively-resistant *Klebsiella pneumoniae*, found in different hospital wards from the Sanjay Gandhi Postgraduate Institute of Medical Sciences hospital in Lucknow, India.

We identified 54 isolates which we grouped, using MLST core genome, into 8 different clusters with high clonality between the isolates of each cluster. Two of these clusters, A and F, predominated above the rest (n=36). The sequencing of the methylase-carrying plasmids revealed the presence of three predominant plasmids: IncA/C found in cluster A, IncFII in cluster F, and IncFIII in clusters B and D. Plasmids were very conserved, the same way as the bacteria which carried them. The IncFII plasmid showed higher variability among isolates, due to variations in the mobilome part of the plasmid. The 54 isolates carried *fosA*, fosfomycin resistance gene, although only one of them was resistant to it.

Our results unveil the existence, adaptation, and propagation of successful clones and plasmids inside different hospital wards. Thanks to these results, we will be able to develop tools for detecting these epidemic plasmids, which will help control their dissemination, an extremely necessary ability in order to stop the propagation of multi-resistant pathogens which worsen and impede infection treatment.

INTRODUCTION

Antimicrobial resistance is a worldwide growing concern that threatens to decrease the effectiveness of prevention and treatment of common infectious diseases (Laxminarayan R *et al.*, 2013). The use of antibiotics has increased over the last few years, being especially disproportionate in the five BRICS countries (Brazil, Russia, India, China, and South Africa) (Gelband H *et al.*, 2014) with emerging national economies. This inappropriate and excessive use of antibiotics has led to develop higher antimicrobial resistance levels in these countries, compared to developed countries (Laxminarayan R *et al.*, 2013; WHO, 2014; Kumar SG *et al.*, 2013).

In the case of India, overpopulation, unsanitary conditions and lack of suitable healthcare facilities have increased the presence of infection diseases being amongst the highest in the world, and becoming the leading cause of mortality in the country (Kumar SG, 2013; Wattal C *et al.*, 2014). This worrisome situation, along with lack of antibiotic prescription policies, the availability of antibiotics without prescription, and their affordable prices, entail an incorrect and abusive usage, mainly of newer ones (Kotwani A *et al.*, 2013).

One of the major problems in public health, related with antibiotic resistance, is caused by the resistance of *Klebsiella pneumoniae* to third generation cephalosporin and carbapenems (WHO, 2014; Roca I *et al.*, 2015; Tzouveleakis LS *et al.*, 2012). *K. pneumoniae* is nowadays one of the main responsables for nosocomial infections, thus the high prevalence of these combinations of bacteria-antibacterial drug resistance raises a great concern about how to treat related severe infection. Combination therapies with last resort antibiotics, such as colistin or tigecycline, along with aminoglycosides, seem to be one of the most commonly used treatment options (Munoz-Price LS *et al.*, 2013; Tängdén T *et al.*, 2015). Nevertheless, the association of acquired 16S rRNA methyltransferase (16S-RMTase) enzymes, which confer high resistance levels to aminoglycosides, with carbapenemases, are becoming more and more usual, drastically narrowing down the remaining therapeutic options (Wachino J *et al.*, 2012; Hidalgo L *et al.*, 2013; Lee CS *et al.*, 2014; Al-Marzooq F *et al.*, 2015; Quiles MG *et al.*, 2015). A further concern relates to these two mobile resistance determinants being usually co-produced by the same plasmid, which would contribute to accelerate their dissemination through bacterial populations.

The aim of this study was to elucidate the roles of the bacteria and the plasmids as vectors in the dissemination and evolution of 16S rRNA methyltransferases and carbapenemases in an Indian hospital.

METHODS

Setting and bacteria collection

A total of 700 clinical isolates were screened from the Sanjay Gandhi Postgraduate Institute of Medical Sciences (Lucknow, India), an 800 bed tertiary care and referral hospital that draws patients from most of the states of northern India, the majority being from Uttar Pradesh and Bihar states. The isolates were selected for their ability to grow on brain heart infusion (BHI) agar, containing both 200 mg/L amikacin and 200 mg/L gentamicin. The selection of *Klebsiella pneumoniae* isolates was performed using the selective medium HiCrome™ *Klebsiella* Selective Agar Base (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The clinical isolates were collected during 2012 (April, May, June, and July) from patients hospitalized in different medical and surgical wards (Emergency, General Hospital, and Critical Care Medicine, along with the Transplants Unit, are located in separated buildings. The rest of wards are placed in the same building but on different floors, as follows: first floor Endocrinology and Endocrine surgery, fourth floor Nephrology, fifth floor Urology, sixth floor Gastroenterology, seventh floor Surgical Gastroenterology, eighth floor Neurology and tenth floor Pulmonary Medicine). Strains were recovered from multiple clinical samples: abdominal pus, blood, tip of central venous catheter, endotracheal aspirate, intercostal drain fluid, percutaneous catheter drain fluid, percutaneous nephrostomy drain fluid, peritoneal fluid, pleural fluid, renal dialysis fluid, tracheal tube aspirate, vaginal secretions, sputum, urine, bile, pancreatic fluid and wound.

Laboratory procedures

Bacterial identification was confirmed using MALDI-TOF mass spectrometry. The antibiotic resistance level was assessed via Minimal Inhibitory Concentration assays using commercial Sensititre GN3F plates (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), with the exception of fosfomycin, for which sensitivity was evaluated by E-test strips (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA). The results were interpreted according to CLSI guidelines (breakpoints of

doxycycline and minocycline) and EUCAST standards (breakpoints of the remainder antibiotics) (CLSI, 2013; EUCAST, 2016). The presence of all 16S methyltransferases genes (*armA*, *rmtA*-*rmtH*), was evaluated by PCR using DNA template from boiled cells and primers previously described (Hidalgo L *et al.*, 2013).

Plasmid DNA was extracted from clinical isolates using a Plasmid Midi kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA). Transformation experiments to isolate the methylases-bearing plasmids were carried out with MAX Efficiency® DH5α™ Competent Cells (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions. Transformants were confirmed to have 16S methyltransferases genes by PCR analysis.

WGS and de novo assembly

DNA was extracted using the UltraClean microbial DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. A DNA library was prepared using the Nextera XT kit (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and then run on a MiSeq instrument (Illumina) for generating paired-end 250-bp reads, aiming at a coverage of at least 60-fold. De novo assembly was performed as previously described (Zhou K *et al.*, 2015; Ferdous M *et al.*, 2015) using CLC Genomics Workbench v7.0.4 (CLC bio A/S, Aarhus, Denmark) after quality trimming (Qs, ≥ 28) with optimal word sizes based on the maximum N50 value.

Core genome phylogenetic analysis

To determine the evolutionary relationship of the isolates, a gene-by-gene typing approach was performed using SeqSphere+ v2.1 (Ridom GmbH, Münster, Germany). In short, an in-house-defined whole genome MLST scheme was developed using the genome of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 (NC_012731.1) (Kluytmans-van den Bergh MF *et al.*, 2016) as the reference genome, to extract open reading frames (ORFs) from the genomes of each isolate by SeqSphere+. Only the ORFs without a premature stop codon, and ambiguous nucleotides from contigs of assembled genomes, were included. This resulted in a total of 4925 genes that were defined as core genome. A neighbor-joining (NJ) tree was constructed based on a distance matrix among the isolates depending on the whole genomes of all isolates.

In silico characterization of the isolates

Assembled genomes were analyzed *in silico* using on line bioinformatics tools from the Center for Genomic Epidemiology (Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark). The identification of acquired antimicrobial resistance genes was performed using Resfinder v2.1

database (Zankari E *et al.*, 2012), with an identity threshold of 98% and a minimum length of 60%. For incomplete genes, the raw sequence data was mapped to the reference gene to confirm that we had the complete gene. The typing plasmid were carried out by uploading the genomes to PlasmidFinder v1.3 (identity threshold 100%) (Carattoli A *et al.*, 2014). MLST allele sequences and ST profiles were established according to the MLST schemes available at the Institute Pasteur MLST Web site (<http://www.pasteur.fr/mlst>).

Sequencing of the methylases-bearing plasmids

E. coli DH5 α transformants with plasmids carrying 16S rRNA methylases were fully sequenced using the Ion Proton™ system. In short, plasmid DNA was obtained using a Plasmid Midi kit. DNA concentration which was determined with the Qubit dsDNA BR Assay. An individually barcoded library preparation was performed with the Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit with auto-size selection. Library amplification (8 cycles) was performed by PCR. Agilent 2100 Bioanalyzer system was used to determine quality and concentration of the libraries. Template preparation and chip loading were carried out using Ion Chef™ System.

Assembly of plasmid sequencing was carried out on the Institut Pasteur Gaxaly server (<https://research.pasteur.fr/fr/tool/pasteur-galaxy-platform/>). Reads were filtered using the fqCleaner tool: minimum length of 50 bp, 80% of bases with quality above 20 and removal of non-confident bases at the 5' and 3' ends. Bowtie2 (Langmead B *et al.*, 2012) was used to map fqCleaner-filtered reads to an *E. coli* DH5 α genomic reference, and only unmapped reads were retained in order to remove gDNA contamination. Assemblies were generated using CLC_Assembler: single-reads, 1000 bp minimum contig size.

***In silico* characterization of methylases-bearing plasmids**

Plasmids incompatibility group and identification of resistance genes were determined using PlasmidFinder v1.3 (identity threshold up to 94%) (Carattoli A *et al.*, 2014) and Resfinder v2.1 (identity threshold up to 98%) (Zankari E *et al.*, 2012) respectively.

Contig alignments of the most predominant plasmids were performed using the Mauve Genome Alignment Software (Darling AE *et al.*, 2010). In order to complete the sequence of each plasmid, the arrangement of contigs was performed by overlapping contigs of the same plasmids with each other using Geneious v 8.1.7 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) (Kearse M *et al.*, 2012) and, when necessary, by blasting against the GeneBank database. Once we had the different complete plasmids, raw sequence data from the WGS of the wild-type isolates was mapped onto them to obtain the completed plasmid from each isolate. Automated annotation

was performed using the RAST server (<http://rast.nmpdr.org>; Aziz *et al.* 2008). The detection of single nucleotide polymorphism (SNPs) was carried out using Geneious v 8.1.7. Árbol filogenético con geneious.

Statistical analysis

Kruskal-Wallis Test, Chi-Squared Test and Fisher's Exact Test were used to determine if there were statistically significant associations between clones and patient's age, sex, and hospital wards where the clones were respectively isolated. All analyses were performed with SAS 9.4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTS

Settings and bacteria collection

Of the 700 clinical isolates, screened from the Sanjay Gandhi Postgraduate Institute of Medical Sciences, 108 (15%) were able to grow in the presence of high levels of aminoglycosides, and 54 of those 108 (49%) were identified as *K. pneumoniae*. The growth of three of those 54 (CM33, CM34 and CM44) was poorly.

K. pneumoniae isolates were collected over the 4 months during which the study was carried out (on July only 2 isolates were obtained), from female (46%) and male (54%) patients with ages between 3 to 78 (table 6). Clinical isolates were present in all of the hospital wards, being clearly predominant in Surgical Gastroenterology, followed by Urology (table 6). Isolates were obtained from all of the clinical samples, except from the tips of central venous catheters, pancreatic fluid and bile. They were obtained mainly from urine samples, followed closely by pus and sputum samples (table 6).

Antimicrobial susceptibility and methyltransferases content

All 54 isolates showed resistance to aminoglycosides, fluoroquinolones, third and fourth-generation cephalosporins, and to different combinations of beta lactams / beta lactamases inhibitors. Furthermore, they presented high levels resistance to monobactams (98%), carbapenems (93%) [meropenem (93%), doripenem (93%), imipenem (81%)] and trimethoprim / sulfamethoxazole (59%). The isolates also presented low resistance levels to doxycycline (30%), minocycline (20%), and colistin (11%). All of the isolates were completely sensitive to tigecycline (table 7). Unexpectedly, the resistance to fosfomycin, an old broad-spectrum antibiotic effective against MDR and XDR infections, commonly used to treat both urinary and non-urinary tract infections (Falagas ME *et al.*, 2016), was extremely low (2%) with only one resistant isolate (intermediate by CLSI, complete by EUCAST).

Methyltransferase genes *armA*, *rmtB*, *rmtC* and *rmtF* were identified in 51 of the 54 isolates in the following respective proportions: 13%, 31%, 41% and 15%. Three isolates were negative to all methyltransferases. Further analysis of these isolates growth in high aminoglycosides concentrations, and the MIC assays against different aminoglycosides, revealed that the isolates don't harbor any methyltransferase. Combinations of more than one methyltransferase gene were identified in a few isolates; a single isolate harbored *rmtC* and *rmtF*, and two others harbored *armA* along with *rmtF*.

Phylogenetic and statistical analysis

MLST results typed the bacterial population into 6 distinct Sequence Types: ST11, ST14, ST15, ST43, ST147, and ST231. The most common ST was the epidemic clone group ST11 (37%, n=20), followed by ST43 (33%, n=18) and ST14 (18%, n=10). On the other hand ST15, ST147 and ST231 only had two clones each (4%, n=2). The phylogenetic analysis of the core genome of the isolates (4925 ORFs shared by all the *K. pneumoniae*) was performed to determine the evolutionary relation between the isolates. The results showed the isolates divided into 8 differentiated clonal clusters, each one of which clustered the isolates with less than 150 SNP in the core genome (figure 16). The phylogeny clusters matched with the STs, except for ST11 and ST14, which were split into two clusters each ([A, B] and [C, D] respectively). Clusters A and F were the most numerous (18 isolates each, 33%) and the most isogenic groups. In Cluster A the majority of isolates were identical; they had no SNPs in their core genome. These identical isolates were grouped in two subclusters with 10 and 3 isolates each. The bigger difference between isolates was only 3 SNPs. Cluster F was the less isogenic: there were more SNPs among isolates being between 1 and 23 SNPs, and had 3 subclusters of identical isolates with only 2 or 3 isolates per subcluster. Cluster C (9 isolates, 16%) was most diverse with a greater number of SNPs among clones. Cluster D included only one isolate (2%) that was close to Cluster C (219 SNPs); isolates of both clusters were typed as ST 14. This was also the case with cluster B (2 isolates, 4%) which was at a distance of 639 SNPs from cluster A (isolates of both clusters were typed as ST11). Clusters E, G and H contained two isolates each, and were clearly separated from the rest.

Clones belonging to each cluster, were isolated from diverse sources and different hospital wards, even from those wards placed in different buildings (table 6 and figure 16). In the figure 1 can be observed that isolates from ST11 were predominantly obtained from gastroenterology (n= 10/18, both medicine and surgery) and isolates from ST43 from urology and nephrology (n= 7/18). Nevertheless, statistical analysis revealed that there were no statistically significant associations among clones and their distribution in the hospital wards, pointing out that there were no clones which adapted to one specific wards.

The statistic analysis of the associations between clones and patient's age and sex were also not significant.

The three big clonal clusters A, C and F contained clones that had been isolated over the previous 4 months. Clones of cluster A were collected starting on the end of April and until the beginning of July, and were mainly isolated in June. Clones of cluster C and F were collected

predominantly in April, while clones of cluster G were isolated during two consecutive days of May, and clones of cluster E and H were collected distantly in time.

Resistome and plasmidome characterization

The *in silico* characterization of the resistome displayed very high prevalences of ESBL combinations (mainly *bla*CTX-M-15 with *bla*OXA1 or *bla*SHV11), carbapenemases (principally *bla*NDM-1), aminoglycosides determinants (both modifying enzymes and methylases), quinolone modifying enzymes (*aac*(6')Ib-cr) and sulfonamide resistant genes (mainly *sul*1) (tables 8 and 9, figure 17). Other resistance determinants to these and other antibiotics were detected, although in less proportion. Among them we must highlight the carbapenemases *bla*OXA181 and *bla*OXA232. The resistome homogeneity was variable inside each cluster. Only the isolates belonged to clusters A, G and H shared the same resistome (table 8). Incompatibility plasmid group analysis determined that the plasmid content from the clinical isolates of each cluster were shared among the greater part of the isolates, and even clusters that were closely related such, as cluster C and D, had the same replicon types (table 8).

Variation analysis of the methylases-bearing plasmids

None of the plasmids from clusters G and D were transformed. Three plasmids were clearly more prevalent than the rest: one IncA/C, one IncFII and one IncFIIy, with maximum sizes of 74633 bp, 94826 bp and 99308 bp respectively (table 10 and figure 20). Unlike IncA/C, IncFII and IncFIIy carried an extended machinery of conjugation (Tra genes) (table 11, figure 20)

The IncA/C plasmid was carried by all of the isolates from cluster A (18 isolates) (table 10). The SNP analysis, using the CM81 plasmid as reference, detected 1 SNP in the whole of the plasmid core (plasmid content shared by all the isolates, 72916 bp) (table 12). The SNP was only located in a hypothetical protein of CM75). The resistome was part of the core since all the isolates harboured the same genes *rmtC*, *aac*(3)-IId, *bla*NDM-1, *bla*DHA-1 and *sul*1.

The IncFII plasmid was carried by all the strains from cluster F (18 isolates) (table 10). The resistome was variable and none of the genes were present on all plasmids (figure 21). However the backbone was highly conserved, having the plasmid core (68903 bp) only 69 SNPs in a reverse transcriptase of CM83 (table 12).

Finally, the IncFIIy plasmid was carried by isolates from clusters B (CM41) and C (CM8, CM5, and CM76) (table 10). This was the only plasmid shared by strains of different sequence typed. The plasmid content was conserved in all the isolates, including the genes of the resistome. Nevertheless, among the three plasmids, this had the most genetic SNP variations,

with a total of 249. These variations were found mainly between the reference isolate used in the analysis, CM8, and CM41 which is the isolate belonging to the other cluster (table 12). The other isolate belonging to cluster B, CM42, carried a different non-typeable plasmid, which harboured a completely different resistome (table 10). The remaining transformed isolates from cluster C also harboured a different plasmid (table 10).

Fosfomycin resistance

Resfinder analysis (identity threshold of 98%) showed a presence of *fosA* in the isolates of cluster G. When the identity threshold was reduced to 90%, *fosA* manifested in all isolates. Nevertheless, all isolates except one (CM27) were susceptible to fosfomycin (table 7). Fosfomycin is an antibiotic that will soon be available in India as a possible last resort antibiotic for complicated Gram negative infections (Saiprasad P V *et al.*, 2016). We performed an in-depth study on the cause of susceptibility in presence of *fosA*, comparing the sequence of *fosA* and the 5'UTR region (500 nucleotides upstream) of the sensitive isolates (one of each cluster) with resistant isolates (our isolate CM27, and two fosfomycin resistant *K. pneumoniae*: TGH 8 and TGH 10 (Sabirova JS *et al.*, 2016). None of the mutations in the nucleotide sequence were clearly related with the reversion to susceptibility. No mutations were found in the promotor, predicted using online tool BPPROM (V. Solovyev *et al.*, 2011). For the rest of the 5'UTR region, only one mutation was shared between the resistant strains TGH 8 and TGH 10, but no with CM27 (figure 18). The nucleotide mutations in the *fosA* sequence were translated into 4 amino acid changes, but none of them were shared by all resistant strains (figure 19).

Tabla 6. Clinical and phylogenetic data of *Klebsiella pneumoniae* isolates.

| Isolate | Hospital Ward | Age | Sex | Clinical sample | Sample Date | ST | Cluster |
|---------|------------------------|-----|-----|-----------------|-------------|-----|---------|
| CM59 | Emergency | 69 | M | ET- aspirate | 26/04/2012 | 11 | A |
| CM16 | Nephrology | 59 | M | Urine | 02/05/2012 | 11 | A |
| CM27 | Gastrology | 64 | F | Blood | 07/05/2012 | 11 | A |
| CM95 | General Hospital | 45 | F | Pus | 07/05/2012 | 11 | A |
| CM4 | Gastrology | 46 | M | Pus | 08/05/2012 | 11 | A |
| CM90 | Surgical Gastrology | 62 | F | Wound Swab | 08/05/2012 | 11 | A |
| CM63 | Gastrology | 17 | F | Sputum | 21/06/2012 | 11 | A |
| CM92 | Surgical Gastrology | 41 | M | Sputum | 25/06/2012 | 11 | A |
| CM13 | Nephrology | 22 | M | Pleural Fluid | 26/06/2012 | 11 | A |
| CM71 | Nephrology | 23 | F | TT- aspirate | 26/06/2012 | 11 | A |
| CM81 | Critical Care Medicine | 59 | M | Sputum | 26/06/2012 | 11 | A |
| CM82 | Surgical Gastrology | 41 | M | Sputum | 26/06/2012 | 11 | A |
| CM32 | Surgical Gastrology | 48 | F | R-Drain Fluid | 27/06/2012 | 11 | A |
| CM35 | Endocrinology | 69 | M | PCD-Drain Flu | 28/06/2012 | 11 | A |
| CM53 | Urology | 53 | M | Urine | 28/06/2012 | 11 | A |
| CM75 | Surgical Gastrology | 73 | M | ET- aspirate | 28/06/2012 | 11 | A |
| CM36 | Pulmonary Medicine | 54 | M | Pus | 03/07/2012 | 11 | A |
| CM39 | General Hospital | 22 | F | Urine | 03/07/2012 | 11 | A |
| CM42 | Surgical Gastrology | 31 | F | Abdominal Pus | 30/04/2012 | 11 | B |
| CM41 | Surgical Gastrology | 61 | F | R-Drain Fluid | 07/05/2012 | 11 | B |
| CM8 | Emergency | 3 | M | Urine | 07/04/2012 | 14 | C |
| CM76 | Endosurgery | 28 | M | PCN-Drain | 15/04/2012 | 14 | C |
| CM33 | Urology | 65 | M | TT-Aspirate | 16/04/2012 | 14 | C |
| CM87 | General Hospital | 13 | F | TT-Aspirate | 16/04/2012 | 14 | C |
| CM22 | Neurology | 60 | F | Renal Dialysis | 20/04/2012 | 14 | C |
| CM102 | Critical Care Medicine | 56 | M | TT-Aspirate | 23/04/2012 | 14 | C |
| CM31 | Surgical Gastrology | 49 | F | R-Drain Fluid | 24/04/2012 | 14 | C |
| CM34 | Surgical Gastrology | 61 | F | R-Drain Fluid | 08/05/2012 | 14 | C |
| CM5 | Urology | 56 | M | Blood | 27/06/2012 | 14 | C |
| CM23 | Urology | 38 | M | Pus | 08/05/2012 | 14 | D |
| CM96 | Urology | 60 | F | Urine | 20/04/2012 | 15 | E |
| CM2 | Surgical Gastrology | 41 | F | ICD-Fluid | 26/06/2012 | 15 | E |
| CM1 | General Hospital | 13 | F | TT-Aspirate | 16/04/2012 | 43 | F |
| CM49 | Nephrology | 78 | M | R-Drain Fluid | 20/04/2012 | 43 | F |
| CM52 | Surgical Gastrology | 47 | M | PCD-Drain Flu | 20/04/2012 | 43 | F |
| CM6 | Gastrology | 56 | M | ET- aspirate | 20/04/2012 | 43 | F |
| CM60 | Pulmonary Medicine | 36 | F | Sputum | 20/04/2012 | 43 | F |
| CM77 | Urology | 66 | M | Urine | 20/04/2012 | 43 | F |
| CM66 | Urology | 63 | M | Blood | 24/04/2012 | 43 | F |
| CM73 | Nephrology | 66 | M | Sputum | 24/04/2012 | 43 | F |
| CM65 | Surgical Gastrology | 65 | M | Wound Swab | 26/04/2012 | 43 | F |
| CM84 | Urology | 44 | M | Urine | 27/04/2012 | 43 | F |
| CM62 | Urology | 65 | M | Urine | 02/05/2012 | 43 | F |
| CM44 | Transplant Unit | 18 | F | Renal Dialysis | 05/05/2012 | 43 | F |
| CM12 | General Hospital | 67 | F | Pus | 08/05/2012 | 43 | F |
| CM55 | Endocrinology | 13 | M | Blood | 08/05/2012 | 43 | F |
| CM45 | Urology | 26 | F | ET- aspirate | 25/06/2012 | 43 | F |
| CM83 | Endocrinology | 48 | F | Sputum | 25/06/2012 | 43 | F |
| CM86 | Endosurgery | 52 | M | PD-Fluid | 26/06/2012 | 43 | F |
| CM109 | Pulmonary Medicine | 67 | F | Pus | 27/06/2012 | 43 | F |
| CM100 | Neurology | 17 | M | ET- aspirate | 01/05/2012 | 147 | G |
| CM46 | Critical Care Medicine | 31 | F | Wound Swab | 02/05/2012 | 147 | G |
| CM64 | Critical Care Medicine | 26 | F | Vaginal Swab | 19/04/2012 | 231 | H |
| CM61 | General Hospital | 48 | F | Pus | 30/04/2012 | 231 | H |

Tabla 7. MIC of the 54 clinical isolates.

| Name | MIC (µg/ml) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------------|-----|-----|-----|------|----------|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-------|-----|------|------|-----|------|------|------|
| | AMI | GEN | TOB | CIP | LEVO | SXT | AZT | FEP | TAZ | FOT | COL | DOX | MIN | TGC | IMI | MERO | DOR | FOS | A/S2 | P/T4 | TIM2 |
| CM5 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | <0,25 | 16 | 16 | 1 | >8 | >8 | >4 | 6 | >64 | >64 | >128 |
| CM1 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | 4 | 4 | 0,5 | >8 | >8 | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM100 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | >16 | 8* | 0,5 | 4* | 4* | >4 | 6 | >64 | >64 | >128 |
| CM102 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | <2 | >16 | >16 | >32 | 1 | 8* | 8* | 1 | >8 | >8 | >4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM109 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | <0,25 | 8* | 8* | 0,5 | >8 | >8 | >4 | 4 | >64 | >64 | >128 |
| CM12 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | >4 | <2 | <2 | <0,25 | >8 | >8 | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM13 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | <0,25 | 4* | 8* | >4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM16 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | 0,5 | 4* | 8* | >4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM2 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | <0,25 | <1 | <1 | <0,5 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM22 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | 8* | 4 | 0,5 | >8 | >8 | >4 | 1 | >64 | >64 | >128 |
| CM23 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | <2 | <2 | <0,25 | 8* | >8 | >4 | 4 | >64 | >64 | >128 |
| CM27 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | 4 | 4 | 0,5 | 4* | 8* | >4 | 96 | >64 | >64 | >128 |
| CM31 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | 8* | 8* | 0,5 | >8 | >8 | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM32 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | <0,25 | 4* | 8* | >4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM33 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | <0,25 | >16 | 8* | 0,5 | <1 | <1 | <0,5 | 4 | >64 | >64 | >128 |
| CM34 | 16* | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | <0,25 | 8* | 4 | 0,5 | <1 | <1 | <0,5 | 8 | >64 | >64 | >128 |
| CM35 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | 4 | 4 | 0,5 | 4* | 8* | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM36 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | 4 | 4 | 0,5 | 4* | 8* | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM39 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | 0,5 | 4* | 8* | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM4 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | <0,25 | 4* | 8* | >4 | 3 | >64 | >64 | >128 |
| CM41 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 2 | >16 | 16 | 1 | >8 | >8 | >4 | 12 | >64 | >64 | >128 |
| CM42 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | >16 | 8* | 0,5 | 2 | 4* | 4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM44 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | 4 | 4 | 0,5 | 2 | 8* | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM45 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | >4 | 4 | <2 | 0,5 | 2 | 8* | 4 | 3 | >64 | >64 | >128 |
| CM46 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | >16 | 8* | 0,5 | 4* | 4* | >4 | 4 | >64 | >64 | >128 |
| CM49 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 2 | 4 | 4 | 0,5 | >8 | >8 | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM52 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | 4 | 4 | 0,5 | 8* | >8 | >4 | 3 | >64 | >64 | >128 |

| Name | MIC (µg/ml) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-------------|-----|-----|-----|------|----------|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-------|-----|------|------|-----|------|------|------|
| | AMI | GEN | TOB | CIP | LEVO | SXT | AZT | FEP | TAZ | FOT | COL | DOX | MIN | TGC | IMI | MERO | DOR | FOS | A/S2 | P/T4 | TIM2 |
| CM53 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | <2 | <2 | <0,25 | 8* | >8 | >4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM55 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | 4 | 4 | 0,5 | >8 | >8 | >4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM59 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | <0,25 | 8* | 8* | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM6 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 2 | 4 | 4 | 0,5 | >8 | >8 | >4 | 3 | >64 | >64 | >128 |
| CM60 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | 4 | <2 | <0,25 | 4* | >8 | >4 | 3 | >64 | >64 | >128 |
| CM61 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | >4 | 4 | 4 | 0,5 | 4* | 8* | >4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM62 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | 4 | 4 | 0,5 | >8 | >8 | >4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM63 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | <0,25 | 4* | 8* | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM64 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | >4 | 4 | 4 | 0,5 | 2 | 4* | 4 | 3 | >64 | >64 | >128 |
| CM65 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | 4 | 4 | <0,25 | >8 | >8 | >4 | 3 | >64 | >64 | >128 |
| CM66 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | 4 | 4 | 0,5 | >8 | >8 | >4 | 4 | >64 | >64 | >128 |
| CM71 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | <0,25 | 4* | 8* | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM73 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | 8* | 4 | 0,5 | >8 | >8 | >4 | 3 | >64 | >64 | >128 |
| CM75 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | <0,25 | 2 | 8* | >4 | 4 | >64 | >64 | >128 |
| CM76 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | 16 | 16 | 1 | >8 | >8 | >4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM77 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | 4 | 4 | 0,5 | >8 | >8 | >4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM8 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | <0,25 | 16 | 16 | 1 | >8 | >8 | >4 | 4 | >64 | >64 | >128 |
| CM81 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | <0,25 | 4* | 8* | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM82 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | <0,25 | 4* | 8* | >4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM83 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | >4 | 4 | <2 | <0,25 | >8 | >8 | >4 | 3 | >64 | >64 | >128 |
| CM84 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | 8* | 4 | 0,5 | >8 | >8 | >4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM86 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | >4 | 4 | <2 | <0,25 | 2 | 8* | 4 | 6 | >64 | >64 | >128 |
| CM87 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | 8* | 4 | 0,5 | >8 | >8 | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM90 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | <0,25 | 4* | 8* | >4 | 1,5 | >64 | >64 | >128 |
| CM92 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | <0,25 | 4* | 8* | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM95 | >32 | >8 | >8 | >2 | 8 | <0,5/9,5 | >16 | >16 | >16 | >32 | 1 | <2 | <2 | <0,25 | 4* | 8* | >4 | 2 | >64 | >64 | >128 |
| CM96 | >32 | >8 | >8 | >2 | >8 | >4/76 | >16 | >16 | >16 | >32 | 0,5 | <2 | <2 | <0,25 | <1 | <1 | <0,5 | 3 | >64 | >64 | >128 |

MIC highlight in bold indicates resistant phenotype

Tabla 8. Resistance genes and plasmid incompatibility groups of clinical isolates identified via Resfinder (98% threshold) PlasmidFinder (100% threshold).

| Isolate | Cluster | Resistance Genes | | | | | | | | | | Incompatibility groups |
|---------|---------|---|---|---------------------------------|------------|---------------|------------------|----------------------|--------------|--------------------|---------------|------------------------|
| | | Aminoglycosides | Beta-lactam | Fluorquinolones | Fosfomicin | Macrolides | Sulfonamides | Trimethoprim | Rifampicin | Chloramphenicol | Tetracycline | |
| CM13 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM16 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM27 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM32 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM35 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM36 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM39 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM4 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM53 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM59 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM63 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM71 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM75 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM81 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM82 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM90 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM92 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM95 | A | <i>aac(3)-IId rmtC aac(6')Ib-cr</i> | <i>blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaDHA-1 blaNDM-1 blaOXA-1</i> | <i>oqx A oqx B aac(6')Ib-cr</i> | | | <i>sul1</i> | | | | | IncFIB IncA/C2 IncFII |
| CM41 | B | <i>aph(3')-Ia strA rmtC aadA1 aac(3)-IIa strB aadA2 aac(3)-IId rmtF</i> | <i>blaTEM-1A blaOXA-9 blaCTX-M-15 blaNDM-1 blaOXA-1 blaSHV-11</i> | <i>oqx B oqx A QnrS1</i> | | <i>mph(A)</i> | <i>sul2 sul1</i> | <i>dfrA14 dfrA12</i> | <i>ARR-2</i> | <i>cmIA1 catA1</i> | <i>tet(A)</i> | IncFIB IncFII IncR |

| Isolate | Cluster | | | | | Resistance Genes | | Sulfonamides | Trimethoprim | Rifampicin | Chloramphenicol | Tetracycline | Incompatibility groups | | | | |
|---------|---------|--|--|--|------------|-------------------------|--|--------------|---------------|------------|-----------------|--------------|------------------------|---------|---------|--------|--------|
| | | Aminoglycosides | Beta-lactam | Fluorquinolones | Fosfomycin | Macrolides | | | | | | | | | | | |
| CM42 | B | aacA4 aac(6')Ib-cr aph(3')-Ia strA aac(3)-IIa strB aadA2 rmtF | blaCTX-M-15 blaNDM-1 blaOXA-1 blaSHV-11 | oqxB oqxA QnrS1 aac(6')Ib-cr | | mph(A) | | sul2 sul1 | dfrA14 dfrA13 | ARR-2 | | tet(A) | IncFIB | IncFII | | | |
| CM102 | C | aadA2 armA aph(3')-Via aac(6')Ib-cr | blaNDM-1 blaOXA-1 blaSHV-28 | oqxA oqxB aac(6')Ib-cr | | msrE mphE | | sul1 | dfrA12 dfrA1 | | catA1 | | IncFII | IncHI1B | IncFIB | | |
| CM22 | C | aadA2 strA strB aadA1 aac(3)-IId armA aph(3')-Via aac(6')Ib-cr | blaOXA-232 blaCTX-M-15 blaSHV-11 blaTEM-1B blaNDM-1 blaOXA-1 | oqxA oqxB aac(6')Ib-cr | | mph(A) erm(B) msrE | | sul1 sul2 | dfrA12 dfrA1 | ARR-2 | cmlA1 catA1 | | IncFII | IncHI1B | IncR | IncFIB | ColKP3 |
| CM31 | C | aadA2 strA strB aadA1 aac(3)-IId armA aph(3')-Via aac(6')Ib-cr | blaOXA-232 blaCTX-M-15 blaNDM-1 blaOXA-1 blaSHV-28 blaTEM-1A | oqxA oqxB aac(6')Ib-cr | | msrE mphE | | sul1 sul2 | dfrA12 dfrA1 | | cmlA1 catA1 | | IncFII | IncHI1B | IncR | IncFIB | |
| CM33 | C | aac(3)-IId aadA1 | blaTEM-1A blaOXA-9 blaCTX-M-15 blaOXA-1 blaSHV-1 | QnrB1 oqxB oqxA | | | | sul1 | dfrA1 | ARR-2 | cmlA1 | | IncR | | | | |
| CM34 | C | aac(6')-Ib aac(3)-IId | blaTEM-1A blaOXA-9 blaCTX-M-15 blaOXA-1 blaSHV-1 | QnrB1 oqxB oqxA aac(6')Ib-cr | | | | sul1 | dfrA1 | ARR-2 | cmlA1 | | IncR | | | | |
| CM5 | C | aac(6')-Ib strA aac(3)-IIa strB aac(3)-IId rmtC | blaOXA-1 blaNDM-1 blaOXA-9 blaCTX-M-15 blaSHV-11 | oqxB oqxA aac(6')Ib-cr | | mph(A) erm(B) | | sul1 sul2 | dfrA1 | ARR-2 | cmlA1 catA1 | | IncFII | IncR | IncFIB | | |
| CM76 | C | aac(6')-Ib strA aac(3)-IIa strB aac(3)-IId rmtC aacA4 | blaOXA-1 blaNDM-1 blaOXA-9 blaCTX-M-15 blaSHV-1 blaTEM-1A | oqxB oqxA aac(6')Ib-cr | | | | sul1 sul2 | dfrA1 | ARR-2 | cmlA1 catA1 | | IncFII | IncR | IncFIB | | |
| CM8 | C | aac(6')-Ib strA aac(3)-IIa strB aac(3)-IId rmtC | blaOXA-1 blaNDM-1 blaOXA-9 blaCTX-M-15 blaSHV-11 | oqxB oqxA | | mph(A) erm(B) | | sul1 sul2 | dfrA1 | ARR-2 | cmlA1 catA1 | | IncFII | IncR | IncFIB | | |
| CM87 | C | aadA2 strA strB aadA1 aac(3)-IId armA aph(3')-Via aac(6')Ib-cr | blaOXA-232 blaCTX-M-15 blaNDM-1 blaOXA-1 blaTEM-1B blaSHV-1 | oqxA oqxB aac(6')Ib-cr | | mph(A) erm(B) msrE mphE | | sul1 sul2 | dfrA12 dfrA1 | ARR-2 | cmlA1 catA1 | | IncFII | IncHI1B | IncR | IncFIB | ColKP3 |
| CM23 | D | aadA2 strA strB aac(3)-IId armA aph(3')-Via aac(6')Ib-cr | blaOXA-232 blaCTX-M-15 blaNDM-1 blaOXA-1 blaOXA-9 | oqxA oqxB aac(6')Ib-cr | | mph(A) erm(B) msrE mphE | | sul1 sul2 | dfrA12 dfrA1 | ARR-2 | cmlA1 catA1 | | IncFII | IncHI1B | IncR | IncFIB | ColKP3 |
| CM2 | E | aacA4 aadA1 aacA4 aac(6')Ib-cr armA aadA2 rmtF | blaTEM-1A blaOXA-9 blaSFO-1 blaOXA-1 blaSHV-28 blaCTX-M-15 | aac(6')Ib-cr oqxB oqxA aac(6')Ib-cr QnrB66 | | msrE mphE | | sul1 | dfrA12 | ARR-2 | catA1 | | IncFIB | IncFII | IncHI1B | IncN | |
| CM96 | E | aacA4 aadA1 aadA2 aac(6')Ib-cr armA rmtF | blaTEM-1A blaOXA-9 blaSFO-1 blaOXA-1 blaSHV-28 blaCTX-M-15 | aac(6')Ib-cr oqxB oqxA aac(6')Ib-cr QnrB66 | | msrE mphE | | sul1 | dfrA12 | ARR-2 | catA1 | | IncFIB | IncFII | IncHI1B | IncN | |
| CM1 | F | aac(6')-Ib rmtB aac(3)-IId aadA1 aadA2 | blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaNDM-1 blaSHV-11 | aac(6')Ib-cr | | mph(A) erm(B) | | sul1 | dfrA12 | | | | IncFIB | IncFII | IncHI1B | | |
| CM109 | F | aac(6')-Ib rmtB aac(3)-IId aadA1 aadA2 | blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaNDM-1 | aac(6')Ib-cr | | | | sul1 | dfrA12 | | | | IncFIB | IncFII | IncHI1B | | |
| CM12 | F | aac(6')-Ib rmtB aac(3)-IId aadA1 aadA2 | blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaNDM-1 blaSHV-11 | aac(6')Ib-cr | | mph(A) erm(B) | | sul1 | dfrA12 | | | | IncFIB | IncFII | IncHI1B | | |
| CM44 | F | aadA1 aac(3)-IId aac(6')-Ib | blaOXA-181 blaTEM-1B blaOXA-9 blaSHV-11 blaCTX-M-15 | aac(6')Ib-cr | | mph(A) erm(B) | | | | | | | IncFIB | IncFII | IncHI1B | | |
| CM45 | F | aac(6')-Ib rmtB aac(3)-IId aadA1 | blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaTEM-1B | aac(6')Ib-cr | | mph(A) erm(B) | | | | | | | IncFIB | IncFII | IncHI1B | | |

Resultados: Capítulo II

| Isolate | Cluster | Resistance Genes | | Sulfonamides | Trimethoprim | Rifampicin | Chloramphenicol | Tetracycline | Incompatibility groups |
|---------|---------|--|--|--|----------------------|------------------|-----------------|--------------|----------------------------|
| | | Aminoglycosides | Beta-lactam | | | | | | |
| CM49 | F | <i>aac(6)-Ib rmtB aac(3)-IIId aadA1 aadA2</i> | <i>blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaTEM-1B blaNDM-1</i> | <i>aac(6)Ib-cr</i> | | <i>sul1</i> | <i>dfrA12</i> | | IncFIB IncFII IncHI1B |
| CM52 | F | <i>aac(6)-Ib rmtB aac(3)-IIId aadA1 aadA2</i> | <i>blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaTEM-1B blaNDM-1</i> | <i>aac(6)Ib-cr</i> | | <i>sul1</i> | <i>dfrA12</i> | | IncFIB IncFII IncHI1B |
| CM55 | F | <i>aac(6)-Ib rmtB aac(3)-IIId aadA1 aadA2</i> | <i>blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaNDM-1</i> | <i>aac(6)Ib-cr</i> | <i>mph(A) erm(B)</i> | <i>sul1</i> | <i>dfrA12</i> | | IncFIB IncFII IncHI1B |
| CM6 | F | <i>aac(6)-Ib rmtB aac(3)-IIId aadA1 aadA2</i> | <i>blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaNDM-1</i> | <i>aac(6)Ib-cr</i> | <i>mph(A) erm(B)</i> | <i>sul1</i> | <i>dfrA12</i> | | IncFIB IncFII IncHI1B |
| CM60 | F | <i>aac(6)-Ib rmtB aadA1</i> | <i>blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15</i> | <i>aac(6)Ib-cr</i> | <i>mph(A) erm(B)</i> | | | | IncFII IncHI1B |
| CM62 | F | <i>aac(6)-Ib rmtB aac(3)-IIId aadA1 aadA2</i> | <i>blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaNDM-1 blaSHV-11</i> | <i>aac(6)Ib-cr</i> | <i>mph(A) erm(B)</i> | <i>sul1</i> | <i>dfrA12</i> | | IncFIB IncFII IncHI1B |
| CM65 | F | <i>aac(6)-Ib rmtB aac(3)-IIId aadA1 aadA2</i> | <i>blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaTEM-1B blaNDM-1</i> | <i>aac(6)Ib-cr</i> | <i>mph(A) erm(B)</i> | <i>sul1</i> | <i>dfrA12</i> | | IncFIB IncFII IncHI1B |
| CM66 | F | <i>aac(6)-Ib rmtB aac(3)-IIId aadA1 aadA2</i> | <i>blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaTEM-1B blaNDM-1</i> | <i>aac(6)Ib-cr</i> | <i>mph(A) erm(B)</i> | <i>sul1</i> | <i>dfrA12</i> | | IncFIB IncFII IncHI1B |
| CM73 | F | <i>aac(6)-Ib rmtB aac(3)-IIId aadA1 aadA2</i> | <i>blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaNDM-1 blaSHV-11 blaTEM</i> | <i>aac(6)Ib-cr</i> | <i>mph(A) erm(B)</i> | <i>sul1</i> | <i>dfrA12</i> | | IncFIB IncFII IncHI1B |
| CM77 | F | <i>aac(6)-Ib rmtB aac(3)-IIId aadA1 aadA2</i> | <i>blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaNDM-1</i> | <i>aac(6)Ib-cr</i> | <i>mph(A) erm(B)</i> | <i>sul1</i> | <i>dfrA12</i> | | IncFIB IncFII IncHI1B |
| CM83 | F | <i>aac(6)-Ib rmtB aac(3)-IIId aadA1 aadA2 strA</i> | <i>blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaNDM-1 blaSHV-11 blaTEM</i> | <i>aac(6)Ib-cr</i> | <i>mph(A) erm(B)</i> | <i>sul1 sul2</i> | <i>dfrA12</i> | <i>ARR-2</i> | IncFIB IncFII IncHI1B IncR |
| CM84 | F | <i>aac(6)-Ib rmtB aac(3)-IIId aadA1 aadA2</i> | <i>blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaTEM-1B blaNDM-1</i> | <i>aac(6)Ib-cr</i> | <i>mph(A) erm(B)</i> | <i>sul1</i> | <i>dfrA12</i> | | IncFIB IncFII IncHI1B |
| CM86 | F | <i>aac(6)-Ib rmtB aac(3)-IIId aadA1</i> | <i>blaOXA-9 blaOXA-181 blaCTX-M-15 blaSHV-11</i> | <i>aac(6)Ib-cr</i> | <i>mph(A) erm(B)</i> | | | | IncFIB IncFII IncHI1B |
| CM100 | G | <i>aac(6)Ib-cr rmtF aacA4 strB strA</i> | <i>blaSHV-11 blaTEM-1B blaNDM-1 blaOXA-1 blaCTX-M-15</i> | <i>aac(6)Ib-cr oqx8 oqxA QnrS1 QnrB1</i> | <i>fosA</i> | <i>sul1</i> | <i>dfrA1</i> | <i>ARR-2</i> | IncFIB IncR |
| CM46 | G | <i>aac(6)Ib-cr rmtF aacA4 strB strA</i> | <i>blaSHV-11 blaTEM-1B blaNDM-1 blaOXA-1 blaCTX-M-15</i> | <i>aac(6)Ib-cr oqx8 oqxA QnrS1 QnrB1</i> | <i>fosA</i> | <i>sul1</i> | <i>dfrA1</i> | <i>ARR-2</i> | IncFIB IncR |
| CM61 | H | <i>rmtF aacA4 aadA2</i> | <i>blaSHV-1 blaTEM-1B blaNDM-1 blaCTX-M-15</i> | <i>aac(6)Ib-cr oqx8 oqxA QnrB1</i> | <i>ermB mphA</i> | <i>sul1</i> | <i>dfrA12</i> | <i>ARR-2</i> | IncFIB |
| CM64 | H | <i>rmtF aacA4 aadA2</i> | <i>blaSHV-1 blaTEM-1B blaNDM-1 blaCTX-M-15</i> | <i>aac(6)Ib-cr oqx8 oqxA QnrB1</i> | <i>ermB mphA</i> | <i>sul1</i> | <i>dfrA12</i> | <i>ARR-2</i> | IncFIB |

Tabla 9. Resistance genes identified by Resfinder with an identity of at least 98%. 4

| Resistance gene | Classification | Number of positive isolates | Percentage of positive isolates |
|----------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| <i>bla</i> CTX-M-15 | ESBLs | 53 | 98% |
| <i>bla</i> OXA1 | ESBLs | 34 | 63% |
| <i>bla</i> OXA9 | Beta-lactamase | 27 | 50% |
| <i>bla</i> OXA232 | Carbapenemases | 4 | 7% |
| <i>bla</i> OXA181 | Carbapenemases | 18 | 33% |
| <i>bla</i> NDM-1 | Carbapenemases | 46 | 85% |
| <i>bla</i> SHV11 | non-ESBLs | 32 | 59% |
| <i>bla</i> SHV1 | ESBLs | 6 | 11% |
| <i>bla</i> SHV28 | ESBLs | 4 | 7% |
| <i>bla</i> DHA1 | AmpC | 18 | 33% |
| <i>bla</i> TEM1A | ESBLs | 7 | 13% |
| <i>bla</i> TEM1B | ESBLs | 13 | 24% |
| <i>bla</i> SFO1 | ESBLs | 2 | 4% |
| <i>aac</i> (3)-IIa | Acetyltransferases | 5 | 9% |
| <i>aac</i> (3)-IId | Acetyltransferases | 45 | 83% |
| <i>aac</i> (6')Ib-cr | Acetyltransferases | 28 | 52% |
| <i>aac</i> (6')-Ib | Acetyltransferases | 21 | 41% |
| <i>aac</i> A4 | Acetyltransferases | 8 | 15% |
| <i>aad</i> A1 | Adenyltransferase | 25 | 46% |
| <i>aad</i> A2 | Adenyltransferase | 25 | 46% |
| <i>aph</i> (3')-VIa | Phosphotransferases | 5 | 9% |
| <i>aph</i> (3')-Ia | Phosphotransferases | 2 | 4% |
| <i>arm</i> A | Methyltransferases | 7 | 13% |
| <i>rmt</i> B | Methyltransferases | 17 | 31% |
| <i>rmt</i> C | Methyltransferases | 20 | 40% |
| <i>rmt</i> F | Methyltransferases | 8 | 15% |
| <i>str</i> A | Phosphotransferases | 12 | 22% |
| <i>str</i> B | Phosphotransferases | 11 | 20% |
| <i>oqx</i> A | Eflux pump | 36 | 67% |
| <i>oqx</i> B | Eflux pump | 36 | 67% |
| <i>Qnr</i> B1 | Protection protein | 6 | 11% |
| <i>Qnr</i> B66 | Protection protein | 2 | 4% |
| <i>Qnr</i> S1 | Protection protein | 1 | 2% |
| <i>aac</i> (6')Ib-cr | Acetyltransferases | 51 | 94% |
| <i>fos</i> A | Glutathione transferase | 2 | 4% |
| <i>erm</i> (B) | Methyltransferases | 22 | 40% |
| <i>mph</i> (A) | Phosphotransferase | 24 | 44% |
| <i>mph</i> (E) | Phosphotransferase | 6 | 11% |
| <i>msr</i> (E) | Eflux pump | 7 | 13% |
| <i>sul</i> 1 | Dihydropteroate synthases | 50 | 93% |
| <i>sul</i> 2 | Dihydropteroate synthases | 10 | 18% |
| <i>dfr</i> A1 | Dihydrofolate Reductase | 12 | 22% |
| <i>dfr</i> A12 | Dihydrofolate Reductase | 24 | 44% |
| <i>dfr</i> A13 | Dihydrofolate Reductase | 1 | 2% |
| <i>dfr</i> A14 | Dihydrofolate Reductase | 2 | 4% |
| <i>ARR</i> -2 | ADP-ribosyltransferase | 17 | 31% |
| <i>cat</i> A1 | Acetyltransferases | 11 | 20% |
| <i>cml</i> A1 | Eflux pump | 10 | 18% |
| <i>tet</i> (A) | Eflux pump | 4 | 7% |

ESBLs : Extended spectrum beta-lactamase

Tabla 10. Data of the plasmid-carrying 16S rRNA methylase of the 54 clinical isolates.

| Isolate | Cluster | Transformation & Plasmid Sequencing | Incompatibility Group | Resistance genes | Plasmid size (BP) | SNP analysis |
|---------|---------|-------------------------------------|-----------------------|---|-------------------|--------------|
| CM04 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74380 | 0 |
| CM13 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74380 | 0 |
| CM16 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74380 | 0 |
| CM27 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74380 | 0 |
| CM32 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74420 | 0 |
| CM35 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74380 | 0 |
| CM36 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74380 | 0 |
| CM39 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74420 | 0 |
| CM53 | A | X | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul2</i> | 73680 | 0 |
| CM59 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 73616 | 0 |
| CM63 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74380 | 0 |
| CM71 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74426 | 0 |
| CM75 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74420 | 1 |
| CM81 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74633 | ref. |
| CM82 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74440 | 0 |
| CM90 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74380 | 0 |
| CM92 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74380 | 0 |
| CM95 | A | ✓ | IncA/C | <i>rmtC aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA-1 sul1</i> | 74380 | 0 |
| CM41 | B | ✓ | IncFIIy | <i>rmtC blaNDM-1 sul1</i> | 99308 | 239 |
| CM42 | B | ✓ | Non-typeable | <i>armA aph3'-IIa blaTEM-116</i> | - | |
| CM102 | C | ✓ | IncHI1B IncFIB IncFII | <i>armA aadA2 sul1 dfrA12</i> | - | |
| CM22 | C | ✓ | IncHI1B IncR | <i>aacA4 aadA1 aac3-IId armA blaNDM-1 blaSHV-11 blaCTX-M-15 aac6'Ib-cr ARR-2 msrE mphE cmlA1 sul1</i> | - | |
| CM31 | C | X | | | | |
| CM33 | C | X | | | | |
| CM34 | C | X | | | | |
| CM5 | C | ✓ | IncFIIy | <i>rmtC blaNDM-1 sul1</i> | 99090 | 6 |
| CM76 | C | ✓ | IncFIIy | <i>rmtC blaNDM-1 sul1</i> | 98946 | 52 |
| CM8 | C | ✓ | IncFIIy | <i>rmtC blaNDM-1 sul1</i> | 98986 | ref. |
| CM87 | C | X | | | | |
| CM23 | D | X | | | | |
| CM2 | E | X | | | | |
| CM96 | E | ✓ | IncN | <i>aacA4 aac6'Ib-cr blaSFO-1 ARR-3</i> | - | |
| CM1 | F | ✓ | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 92294 | 0 |
| CM109 | F | ✓ | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB blaTEM-1</i> | 86039 | 0 |
| CM12 | F | ✓ | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 92580 | 0 |
| CM44 | F | X | IncFII | <i>blaTEM-1 mphA ermB</i> | 85681 | 0 |
| CM45 | F | ✓ | IncFII | <i>rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 85546 | 0 |
| CM49 | F | X | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB blaTEM-1</i> | 86577 | 0 |
| CM52 | F | ✓ | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB</i> | 86318 | 0 |
| CM55 | F | ✓ | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 94693 | 0 |
| CM6 | F | ✓ | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 92571 | 0 |
| CM60 | F | ✓ | IncFII | <i>rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 84026 | ref. |
| CM62 | F | ✓ | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 94720 | 0 |
| CM65 | F | ✓ | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 94759 | 0 |
| CM66 | F | ✓ | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 94826 | 0 |
| CM73 | F | ✓ | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 94802 | 0 |
| CM77 | F | ✓ | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 94331 | 0 |
| CM83 | F | ✓ | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 94716 | 69 |
| CM84 | F | ✓ | IncFII | <i>dfrA12 aadA2 sul1 blaNDM-1 rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 94713 | 0 |
| CM86 | F | ✓ | IncFII | <i>rmtB blaTEM-1 mphA ermB</i> | 86466 | 0 |
| CM100 | G | X | | | | |
| CM46 | G | X | | | | |
| CM61 | H | ✓ | IncFIB | <i>aacA4 rmtF blaNDM-1 aac6'Ib-cr qnrB1 ARR-3</i> | - | |
| CM64 | H | X | | | | |

Highlight in the same color indicates the isolates that share the same plasmid. Ref. indicates the isolates which plasmids were used as reference in the SNPs variation analysis

Tabla 11. Gene content of the predominant plasmids via RAST annotation.

IncFII

| Classification | Gene | Function |
|-----------------------|---|--|
| Antibiotic resistance | blaNDM-1 | Beta-lactamase |
| | blaTEM-1 | Beta-lactamase |
| | dfrA12 | Dihydrofolate reductase |
| | sul1 | Dihydropteroate synthase |
| | mphA | macrolide 2'-phosphotransferase |
| | rmtB | Ribosomal RNA methyltransferase |
| | ermB | Adenine-N(6)-methyltransferase |
| | aadA2 | Streptomycin 3"-O-adenylyltransferase |
| Conjugal transfer | PSLT087 | Conjugative transfer protein PSLT087 |
| | PSLT093 | Conjugative transfer protein PSLT093 |
| | TraI | IncF plasmid conjugative transfer DNA-nicking and unwinding protein |
| | FinO | IncF plasmid conjugative transfer fertility inhibition protein |
| | TraM | IncF plasmid conjugative transfer mating signal transduction protein |
| | TraX | IncF plasmid conjugative transfer pilin acetylase |
| | TraA | IncF plasmid conjugative transfer pilin protein |
| | TraB | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraC | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraE | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraF | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraH | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraK | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraL | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraU | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraV | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraW | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraD | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TraG | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TraN | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TraP | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TraQ | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TraR | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TrbA | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TrbB | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TrbC | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TrbD | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TrbE | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TrbF | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TrbI | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TrbJ | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TraJ | IncF plasmid conjugative transfer regulator |
| | TraY | IncF plasmid conjugative transfer regulator |
| | TraS | IncF plasmid conjugative transfer surface exclusion protein |
| | TraT | IncF plasmid conjugative transfer surface exclusion protein |
| | DsbD | protein-disulfide reductase |
| | GroEL | Heat shock protein 60 family chaperone |
| | GroEL | Heat shock protein 60 family chaperone |
| | PsiA | PsiA protein |
| Plasmid maintenance | PemI | Toxin-antitoxin system |
| | PemK | Toxin-antitoxin system |
| Plasmid replication | ATPase involved in DNA repair | ATPase involved in DNA repair |
| | RepA1 | RepA1 |
| | Replication regulatory protein repA2 | Replication regulatory protein |
| | Retron-type RNA-directed DNA polymerase | Retron-type RNA-directed DNA polymerase |
| Virulence | Retron-type RNA-directed DNA polymerase | Retron-type RNA-directed DNA polymerase |
| | Single-stranded DNA-binding protein | Single-stranded DNA-binding protein |
| Mobile element | McmM | microcin M activity protein |
| | Mobile element | Mobile element protein |
| | Mobile element | Mobile element protein |
| | Mobile element | Mobile element protein |
| | Mobile element | Mobile element protein |
| | Mobile element | Mobile element protein |
| | Mobile element | Mobile element protein |
| | Mobile element | Mobile element protein |
| | transposase | transposase |
| | InsA | transposase |

| | | |
|----------------------|---|---|
| Other | Adenine-specific methyltransferase | Adenine-specific methyltransferase |
| | Adenine-specific methyltransferase | Adenine-specific methyltransferase |
| | Adenine-specific methyltransferase | Adenine-specific methyltransferase |
| | Dienelactone hydrolase and related enzymes | Dienelactone hydrolase and related enzymes |
| | EmrE | Ethidium bromide-methyl viologen resistance |
| | Haemolysin expression modulating protein | modulators of bacterial gene expression |
| | Na ⁺ /H ⁺ -exchanging protein | Na ⁺ /H ⁺ -exchanging protein |
| | Phosphoribosylanthranilate isomerase (| Phosphoribosylanthranilate isomerase |
| | Putative antirestriction protein | Putative antirestriction protein |
| | putative cytoplasmic protein | putative cytoplasmic protein |
| | NanR | Transcriptional regulator |
| | TetR family | Transcriptional regulator |
| | X polypeptide | X polypeptide |
| | YcgB | Unknown |
| | YdaB | Unknown |
| | YhfA | Unknown |
| | YihA | Unknown |
| | bleomycin resistance protein | bleomycin resistance protein |
| | Hypothetical protein | conserved hypothetical protein |
| | Hypothetical protein | conserved hypothetical protein |
| Hypothetical protein | FIG00244619 | Unknown |
| | FIG00638373 | Unknown |
| | FIG00638431 | Unknown |
| | FIG00638607 | Unknown |
| | FIG00638906 | Unknown |
| | FIG00638906 | Unknown |
| | FIG00639321 | Unknown |
| | FIG00642820 | Unknown |
| | FIG00642820 | Unknown |
| | FIG00642953 | Unknown |
| | FIG00643417 | Unknown |
| | FIG00643981 | Unknown |
| | FIG00644824 | Unknown |
| | FIG01046273 | Unknown |
| | FIG01068181 | Unknown |
| | FIG074102 | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |
| | hypothetical protein | Unknown |

IncA/C

| Classification | Gene | Funtion |
|-----------------------|--|---|
| Antibiotic resistance | aac(3)-IId blaNDM-1 blaDHA sul1 rmtC | Aminoglycoside N(3')-acetyltransferase II Carbapenemase Beta-lactamase Dihydropteroate synthase 16S rRNA Methylases |
| Conjugal transfer | TraF TraH TraG DNA primase DsbA | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein IncF plasmid conjugative transfer protein mediated in bacterial conjugation Periplasmic thiol:disulfide interchange protein |
| Plasmid maintenance | FtsH | Cell division protein |
| Plasmid replication | DNA polymerase III DNA replication terminus site-binding protein DNA-binding protein HU-beta RepA DNA helicase ParA ParB | 3'-5' exonucleases DNA replication terminus site-binding protein DNA-binding protein HU-beta plasmid replication protein putative DNA helicase Plasmid partitioning protein Plasmid partitioning protein |
| Virulence | Phage protein | |
| Mobile element | TniA TniB Mobile element Mobile element Mobile element Mobile element Mobile element Mobile element Mobile element Mobile element Mobile element Mobile element | Putative transposase Putative transposase Mobile element protein Mobile element protein Mobile element protein Mobile element protein Mobile element protein Mobile element protein Mobile element protein Mobile element protein Mobile element protein Mobile element protein |
| Otros | micrococcal nuclease Bleomycin Tunicamycin Rod shape determination protein Glycine cleavage system transcriptional activator Microsomal dipeptidase (ClpP class) DNA methyltransferase ArsR family Transcriptional activator HybF | SNase-like bleomycin resistance protein Rod shape determination protein Glycine cleavage system transcriptional activator Periplasmic serine proteases putative DNA methyltransferase Transcriptional regulator Transcriptional activator [NiFe] hydrogenase nickel incorporation protein |

IncFIIy

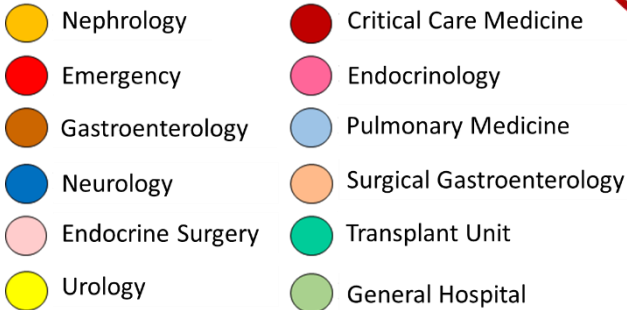
| Classification | Gene | Function |
|-----------------------|---|--|
| Antibiotic resistance | blaNDM-1 | Beta-lactamase |
| | sul1 | Dihydropteroate synthase |
| | rmtC | Ribosomal RNA methyltransferase |
| Conjugal transfer | ArdA | Antirestriction protein |
| | KlcA | Antirestriction protein |
| | DsbD | Protein-disulfide reductase |
| | GroEL | Heat shock protein 60 family chaperone |
| | GroES | Heat shock protein 60 family co-chaperone |
| | Tral | IncF plasmid conjugative transfer DNA-nicking and unwinding protein |
| | FinO | IncF plasmid conjugative transfer fertility inhibition protein |
| | TraM | IncF plasmid conjugative transfer mating signal transduction protein |
| | TraX | IncF plasmid conjugative transfer pilin acetylase |
| | TraA | IncF plasmid conjugative transfer pilin protein |
| | TraB | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraC | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraE | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraF | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraH | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraK | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraL | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraU | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraV | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraW | IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein |
| | TraD | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TraG | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TraN | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TraP | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TraQ | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TrbB | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TrbC | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TrbI | IncF plasmid conjugative transfer protein |
| | TraY | IncF plasmid conjugative transfer regulator |
| | Plasmid conjugative transfer endonuclease | Plasmid conjugative transfer endonuclease |
| | PsiB | Plasmid SOS inhibition protein |
| | PsiA | Plasmid SOS inhibition protein |
| Plasmid maintenance | CcdA | Toxin-antitoxin system |
| | CcdB | Toxin-antitoxin system |
| Plasmid replication | ParA | Plasmid partitioning protein |
| | ParB | Plasmid partitioning protein |
| | DNA replication protein | DNA replication protein |
| | UmuD | Error-prone repair protein |
| | UmuC | Error-prone, lesion bypass DNA polymerase V |
| | Resolvase | RepFIB associated resolvase |
| | Protein A | RepFIB replication protein A |
| Virulence | repA | Replication regulatory protein |
| | DNA polymerase III theta subunit | DNA polymerase III theta subunit (EC 2.7.7.7) |
| Mobile element | Gifsy-2 | Prophage protein |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | Mobile element protein | Mobile element |
| | TniA | Mobile element |
| | TniB | Mobile element |
| | InsA | Mobile element |

[illegible]

Tabla 12. SNPs variation analysis of the three predominant plasmids.

| Plasmid | Nº isolates | Maximun plasmid size | Plasmid core size | SNP | Variant Frequency | Localization | Isolates with SNPs | |
|---------|-------------|-------------------------|----------------------|-----|-------------------|---|---------------------|----------------|
| IncA/C | 18 | 74633 | 72916 | 1 | 5.9% | Hypothetical protein | CM75 | |
| IncFII | 18 | 94826 | 67767 | 69 | 5.9% | Retron-type RNA-directed DNA polymerase | CM83 | |
| IncFIIy | 4 | 99308 | 98093 | 249 | 4 | 7 SNPs in Hypothetical protein ; 52 SNPs in | 6 SNPs CM5; 52 SNPs | |
| | | | | | 42 | Intergenic region ; 37 SNPs in genes (29 | | CM76; 239 SNPs |
| | | | | | 203 | Resolvase, 8 RepA) ; 153 SNPs in mobile | | CM41 |
| | | | | | 33.3% | elements | | |

The reference plasmids used in the analysis were from the isolates CM81 (IncA/C), CM60 (IncFII) and CM8 (IncFIIy).



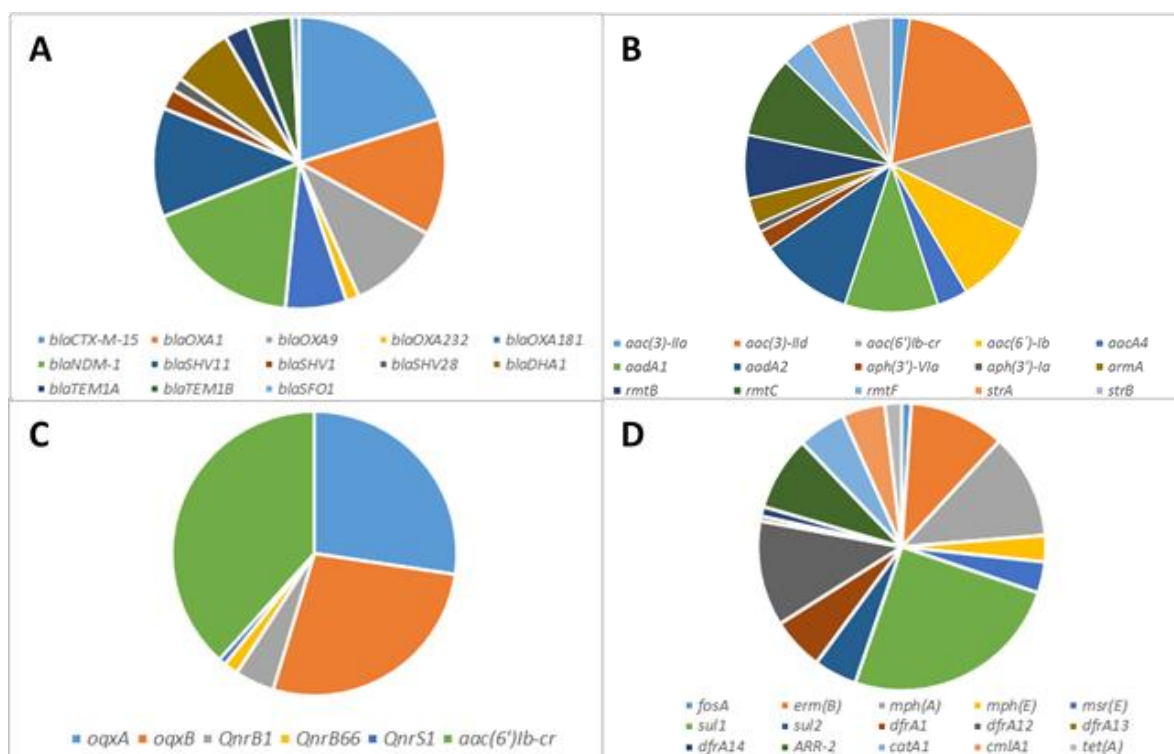


Figura 17. Percentage of prevalence of resistance genes identified via Resfinder (98% identity threshold). A: Betalactams resistance genes, B: Aminoglycosides resistance genes, C: fluoroquinolones resistance genes, D: other resistance genes.

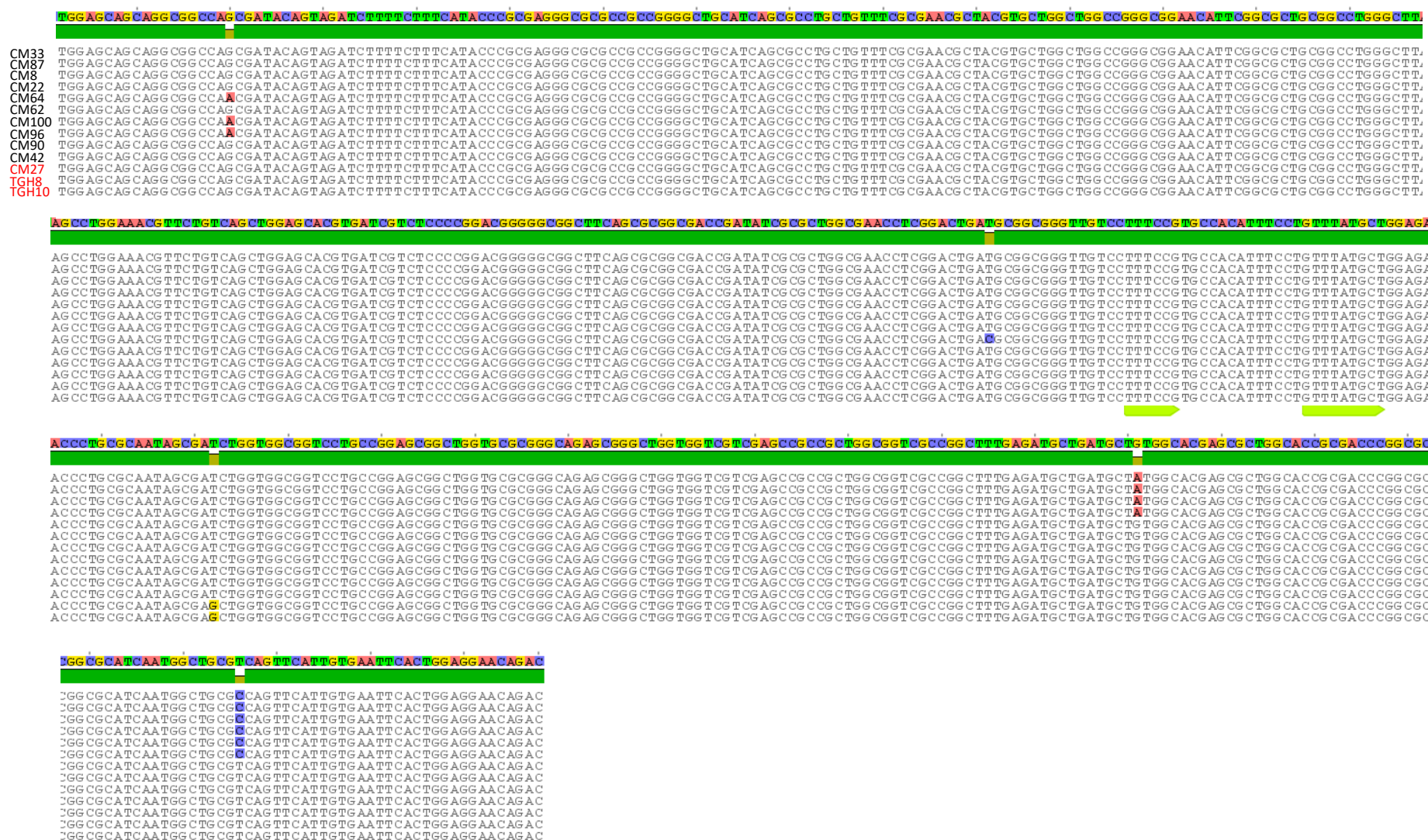


Figura 19. Amino acid alignment of *fosA*

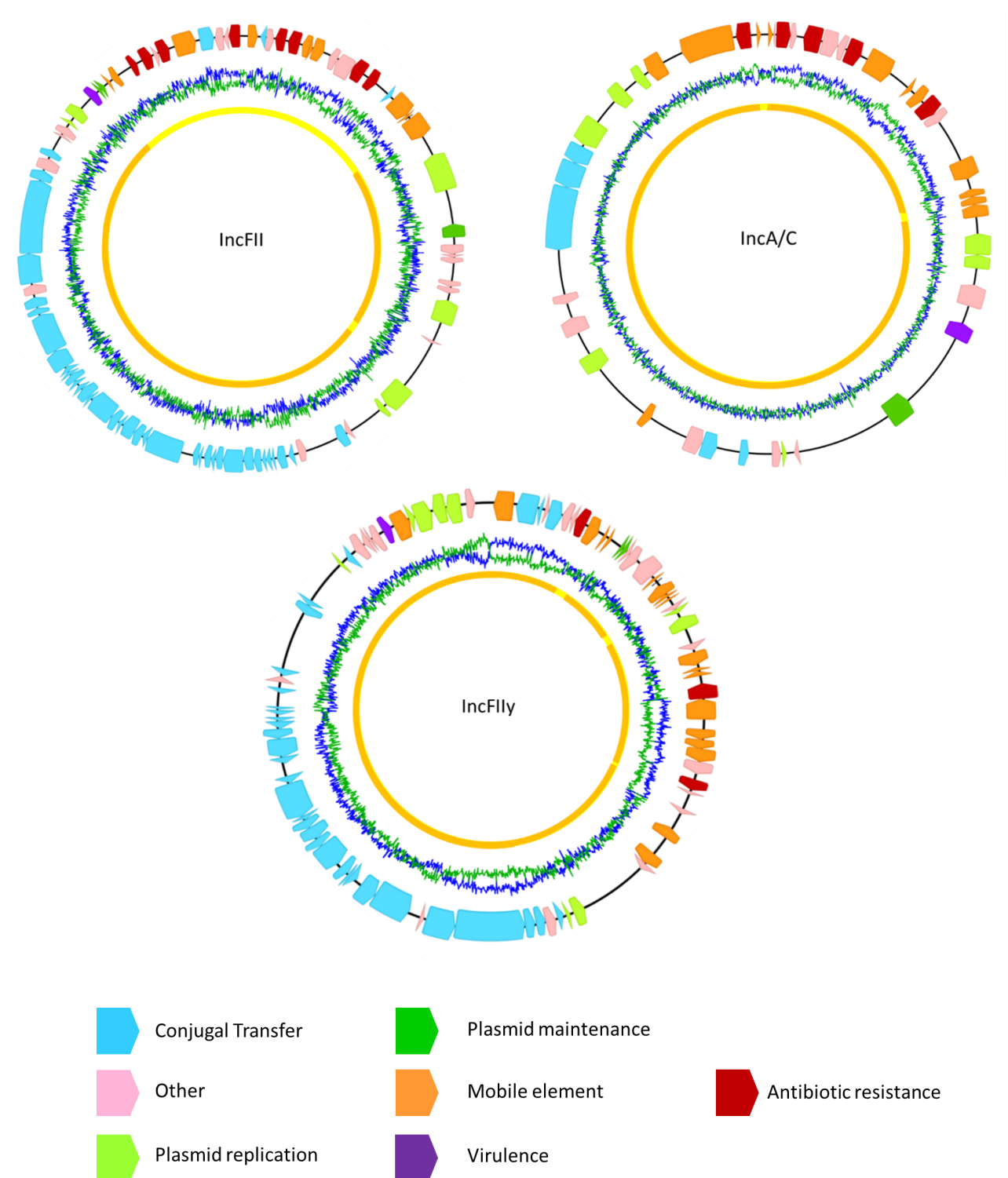


Figura 20. Schematic maps of predominant plasmids. Genes are denoted by arrows and colored based on gene function classification. The innermost circle shows the plasmid core used in the SNPs variant analysis (orange) and the variable region (yellow). The blue-green circle presents GC-AT content.

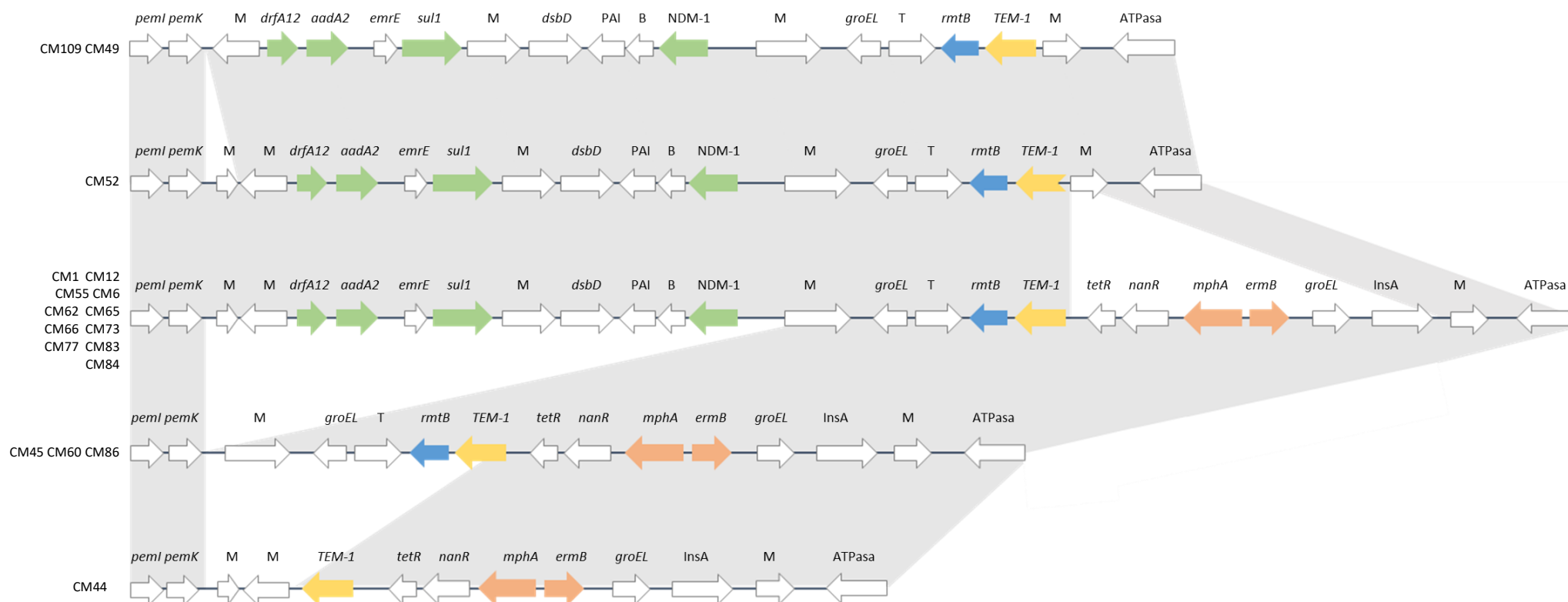


Figura 21. Different genetic organization of the resistome from plasmid IncFII and its prevalence between the isolates of cluster F

DISCUSSION

We have detected high prevalence of aminoglycosides resistance during the three months that we performed the study. Besides this aminoglycosides resistance was associated to the dissemination of two epidemic *K. pneumoniae* which were distributed through the hospital. Besides methylases, the bacteria harbor carbapenemases resistance genes. The prevalence to this carbapenemases resistance gene were really high.

The two clones were not associated to any hospital ward, which means that the clones were completely distributed inside the hospital. These clones carried two plasmids. One of them was, as the clone, very conserved. On the other hand, the other plasmid has evolved acquiring resistance genes. This plasmid was found in 4 different stages depending on the resistance genes. The plasmid with more resistance gene was the most prevalent, suggesting that the more successful plasmid is the plasmid that persists in the hospital environment.

All the isolates carried on a fosfomicin gene *fosA*. However only one strain was resistant. The study of possible mutations responsible for the suppression of the gene functionality did not show any mutation responsible for the susceptible phenotype. Nevertheless the presence of this gene in clinical isolates which can be subject to fosfomicin pressure, when fosfomicin will be used in India, can generate mutation that easily return to resistance phenotype to fosfomicin quickly disabling the antibiotic.

On the prevalent plasmid, *IncFII* was identified in an Australian patient who had travelled to the North part of India. This discovery supports the evidence that resistance doesn't know about borders and can suggest that this plasmid is circulating in the population and not only in the hospital.

CAPÍTULO III

**Spread of *mcr-1*-carrying *Enterobacteriaceae* in sewage
water from Spain**

ABSTRACT

The mobile colistin resistance gene *mcr-1* has been worldwide identified in human and animal sources, while data on the occurrence in the environment is still largely unknown. In this study we investigate the presence of *mcr-1* harboring *Enterobacteriaceae* in water samples obtained from rivers and waste water treatment plants in the area of Barcelona, Spain. Thirty multidrug resistant isolates bearing *mcr-1*, twenty nine *Escherichia coli* (ST632 and ST479) and one *Klebsiella pneumoniae* (ST526) were identified in sewage from two different waste water treatment plants, whereas the gene was not found in river water. All isolates including the *K. pneumoniae* harbouring *bla*CTX-M-55 and *bla*TEM-1. *mcr-1* was in all cases associated to an IncI2 plasmid which only conferred resistance to colistin. *mcr-1* was harbored by two predominant *E. coli* clones that were found in both waste water treatment plants. The study showed a high occurrence of *mcr-1* in sewage of Barcelona, mainly due to the dissemination of two *E. coli* pulsotypes that are circulating in the population. The presence of *mcr-1* in the environment is cause of concern, and suggests high prevalence of *mcr-1* in the community.

INTRODUCTION

Since its discovery in 1949, colistin (polymyxin E) has been widely used in veterinary medicine, while its application in humans was restricted due to its toxicity (Falagas ME *et al.*, 2005). However, as a consequence of the emergence of XDR bacteria, colistin became a last resort therapeutic agent against life-threatening infections (Catry B *et al.*, 2015)

After the first identification of *mcr-1*, the unique transferable resistance mechanism to colistin in China by Liu *et al.* (Liu YY *et al.*, 2016) this gene has been largely described in *Enterobacteriaceae* from both humans and animals (livestock and food) worldwide (Skov RL *et al.*, 2016). However, it has only been detected in two *E. coli* isolates from environmental sources in Switzerland and Malaysia (Petrillo M *et al.*, 2016; Zurfuh K *et al.*, 2016).

In this work, we identified high occurrence of *mcr-1* in *Enterobacteriaceae* present in sewage water in Barcelona, Spain.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolation

The samples were collected from July to November 2013 from river and sewage water in the area of Barcelona. Eight samples were taken from two Spanish rivers, the Cardener and the Llobregat. From each river, samples were taken from water (3 samples) and sediments (1 sample) at two locations and different dates (figure 1). Ten milliliters of the river water were filtered through a cellulose membrane (0.45 μ m pore size), after which the filter was placed on MacConkey agar plates (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) without colistin antibiotic pressure. Likewise, five Grams of sediments from each river were homogenized 1/10 in PBS, centrifuged for 5 min at 300 x g and the resulting supernatant was then plated onto MacConkey agar without colistin. Five sewage samples were obtained at different dates from two wastewater treatment plants (WWTP), located in the Baix Llobregat, three samples from El Prat and two samples were obtained from Gavá. Samples were ten-fold diluted in PBS and plated onto MacConkey agar without colistin. Up to 10 lactose-positive colonies from each sampling site and date were analyzed, to avoid repetitive isolation of the same clone. From all these, finally 90 isolates from sewage and 105 from river, distributed from different sites and dates, were used for this study.

Bacterial identification, PCR and susceptibility testing

The bacterial species were subsequently identified via MALDI-TOF mass spectrometry (VISAVET, Madrid, Spain). The presence of the *mcr-1* gene was detected via PCR from each colony as described by Liu *et al.* (Liu YY *et al.*, 2016) These primers amplified both *mcr-1* and *mcr-1.2* recently described (Di Pilato V *et al.*, 2016). The antibiotic resistance level was assessed MIC using commercial Sensititre EUVSEC plates (Trek Diagnostics, Inc., Westlake, OH). The results were interpreted following the EUCAST guidelines for Enterobacteriaceae (EUCAST, 2016). Multiplex PCR was performed for the detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and plasmid mediated AmpC β -lactamases as previously described (Dallenne C *et al.*, 2010).

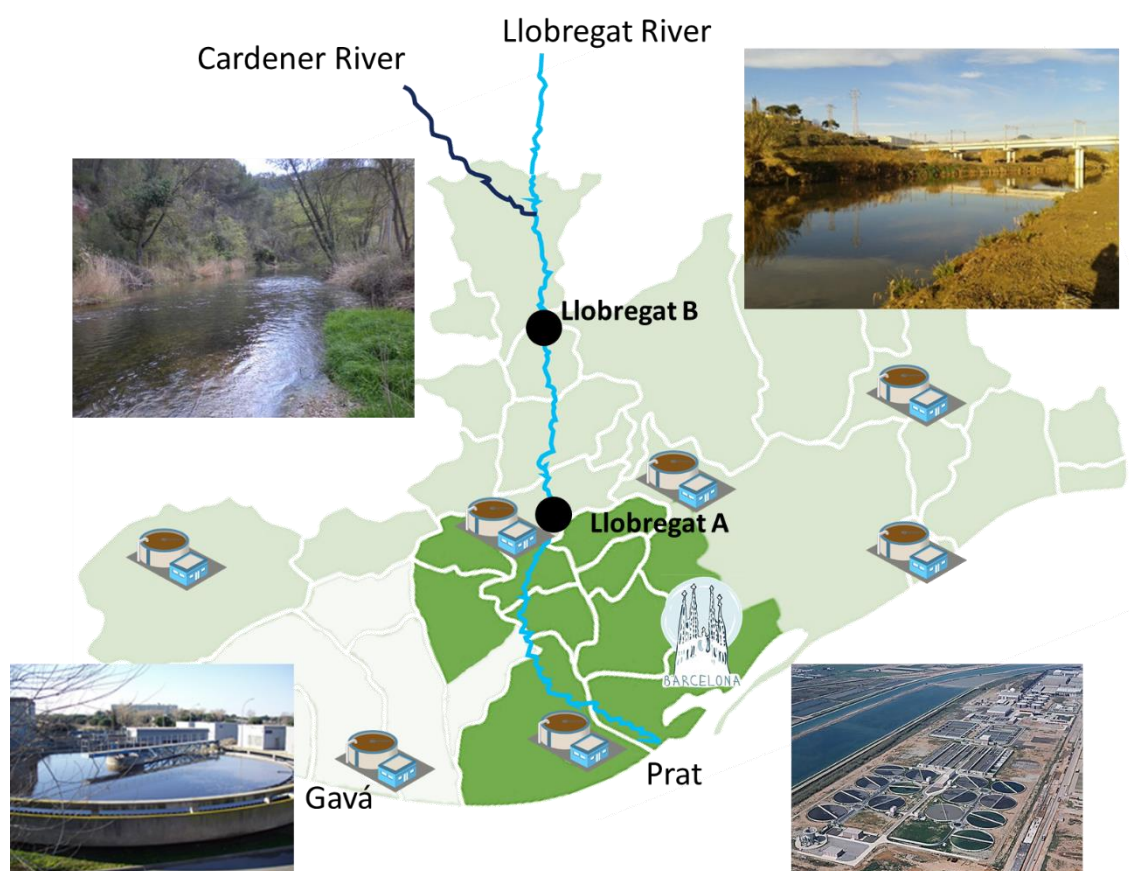


Figura 22. A map of the metropolitan area of Barcelona showing the seven different waste-water plants. Each treatment plant collects the sewage from one specific area. The collection area of the biological wastewater treatment plant Baix Llobregat (*El Prat*) is highlighted in dark green whereas the area of the biological wastewater treatment plant Gavà is highlighted in pale green. The Llobregat river is presented in light blue and the Cardener river in dark blue.

Strain typing

The clonal relatedness of the *mcr-1* positive isolates was determined via PFGE as previously described (Hidalgo L *et al.*, 2013). Briefly, DNA plugs were digested using XbaI restriction enzyme (Takara Bio Inc, Japan) for 14 hours. PFGE was undertaken on a CHEF-DR III (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the following parameters: running time 22 h, temperature 14°C, field strength 6V/cm², angles 120°, initial pulse time 2.2s and final pulse time 63.8 s. Moreover, Multilocus Sequence Typing (MLST) analysis was performed following the protocols described on the Pasteur MLST website (*E. coli* and *K. pneumoniae* MLST, www.pasteur.fr/mlst) and Warwick MLST website (*E. coli* MLST, warwick.ac.uk/mlst/).

Plasmid characterization

Plasmid DNA was extracted from one isolate per pulsotype using a Plasmid Midi Kit (Quiagen Inc., CA, USA). Transformations were then carried out using electrocompetent *Escherichia coli* DH5 α as the recipient (Gutierrez B *et al.*, 2012). The resulting transformants were selected on BHI agar plates with colistin (2mg/L) and screened for *mcr-1* by PCR (Liu YY *et al.*, 2016). The antibiotic resistance profile of the transformants was determined according to EUCAST (EUCAST, 2016). A PCR-based replicon typing kit (Diateva, Fano, Italy) was used to classify the plasmids according to their incompatibility group.

RESULTS

A total of 195 isolates were obtained from the river and sewage sampling. MALDI-TOF revealed the presence of the following Enterobacteriaceae: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *C. koseri*, *Enterobacter kobei*, *E. cloacae*, *E. ludwigii* and *E. asburiae*. None of the 105 isolates collected from the river was positive to *mcr-1*. On the contrary, 30 of the 90 isolates recovered from the sewage of both WWTP, were positive to *mcr-1*. All the *mcr-1* positive Enterobacteriaceae were *E. coli* except one identified as *K. pneumoniae*.

The antibiotic susceptibility testing showed that the 30 isolates exhibited resistance to many antibiotics such as quinolones, aminoglycosides and beta-lactams, including third generation cephalosporins (table 1). All isolates harbouring *blaCTX-M-55* and *blaTEM-1*. Interestingly, one of the isolates containing the *mcr-1* gene, BB1459, was susceptible to colistin. The *E. coli* PFGE results revealed two predominant patterns, pulsotype I (12 isolates) and II (15 isolates), present in the two WWTP (Table 1, Figure S1). MLST was performed in representative *E. coli* isolates from the different pulsotypes and the *K. pneumoniae* isolate (figure 2). Twenty eight *E. coli* (pulsotype I, II and III) belonged to the same infrequent STs, Warwick identified them as ST1196 and Pasteur as ST632, both ST are recently described and related with nosocomial infections caused by carbapenemase-producing *E. coli* (Tavares CP *et al.*, 2015; Stolle I *et al.*, 2013). The non-typable *E. coli* BB1459 was identified by Pasteur data base as ST479 and Warwick as ST224, and the *K. pneumoniae* as ST526.

Plasmids harbouring *mcr-1* from one *E. coli* isolate per pulsotype (corresponding to pulsotypes I, II, III and the untypeable isolate BB1459) and the *K. pneumoniae* isolate, were successfully transformed in *E. coli* DH5 α . All the plasmid transformed belonged to the incompatibility group IncI2 and no coexistence with other antibiotic resistance was observed (table 1). Although BB1459 was susceptible to colistin, its transformant was resistant to colistin (MIC 4 mg/L), confirming the functionality of the gene.

Tabla 13. Epidemiological data and MICs of the 30 isolates positive for mcr-1 obtained from sewage plants in Barcelona, Spain.

| Name | Pulsotype | Source | TMP | NAL | CIP | TET | CHL | AMP | CTX | CAZ | MEM | GEN | TGC | CST |
|---------------------|--------------|------------|-------|------|-------|-----|------|-----|-------|------|-------|------|-------|-----|
| BB1418 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1422 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | >8 | <0,03 | > 32 | 1 | 4 |
| BB1427 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | 0,5 | 4 |
| BB1430 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | 0,5 | 4 |
| BB1433 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1437 | I | El Prat | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | 1 | 4 |
| BB1438 | I | El Prat | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | 2 | 4 |
| BB1450 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1451 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1452 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | 0,5 | 4 |
| BB1455 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1456 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | 0,5 | 4 |
| BB1420 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1461 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1428 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1429 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | 1 | 4 |
| BB1431 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1434 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1435 | II | El Prat | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | 0,5 | 4 |
| BB1436 | II | El Prat | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | 1 | 8 |
| BB1447 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1448 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1449 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | 0,5 | 4 |
| BB1453 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1454 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1457 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1458 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | 0,5 | 4 |
| BB1425 | III | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0,03 | > 32 | 0,5 | 4 |
| BB1459 | Untypeable | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | <8 | >64 | >4 | >8 | <0,03 | > 32 | 0,5 | <1 |
| BB1460 ^a | ND | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 8 | <0,03 | > 32 | <0,25 | 4 |
| BB1438T | Transformant | - | <0,25 | 64 | <0,06 | <2 | <8 | 2 | <0,25 | <0,5 | <0,03 | <0,5 | <0,25 | 4 |
| BB1460T | Transformant | - | <0,25 | 64 | <0,06 | <2 | <8 | 2 | <0,25 | <0,5 | <0,03 | <0,5 | <0,25 | 4 |
| BB1459T | Transformant | - | <0,25 | 64 | <0,06 | <2 | <8 | 2 | <0,25 | <0,5 | <0,03 | <0,5 | <0,25 | 4 |
| BB1428T | Transformant | - | <0,25 | 64 | <0,06 | <2 | <8 | 2 | <0,25 | <0,5 | <0,03 | <0,5 | <0,25 | 4 |
| BB1425T | Transformant | - | <0,25 | 64 | <0,06 | <2 | <8 | 2 | <0,25 | <0,5 | <0,03 | <0,5 | <0,25 | 4 |
| DH5 α | - | Laboratory | <0,25 | 64 | <0,06 | <2 | <8 | 2 | <0,25 | <0,5 | <0,03 | <0,5 | <0,25 | <1 |

SMX: sulfamethoxazole; TMP: trimethoprim; NAL: nalidixic acid; CIP: ciprofloxacin; AMP: ampicillin; FOT: cefotaxime; TAZ: ceftazidime; GEN: gentamicin; CST: colistin; TET: tetracycline; AZI: azithromycin; CHL: chloramphenicol; TGC: tigecycline. ND: not determined. ^a *K. pneumoniae*. Resistance is highlighted in bold.

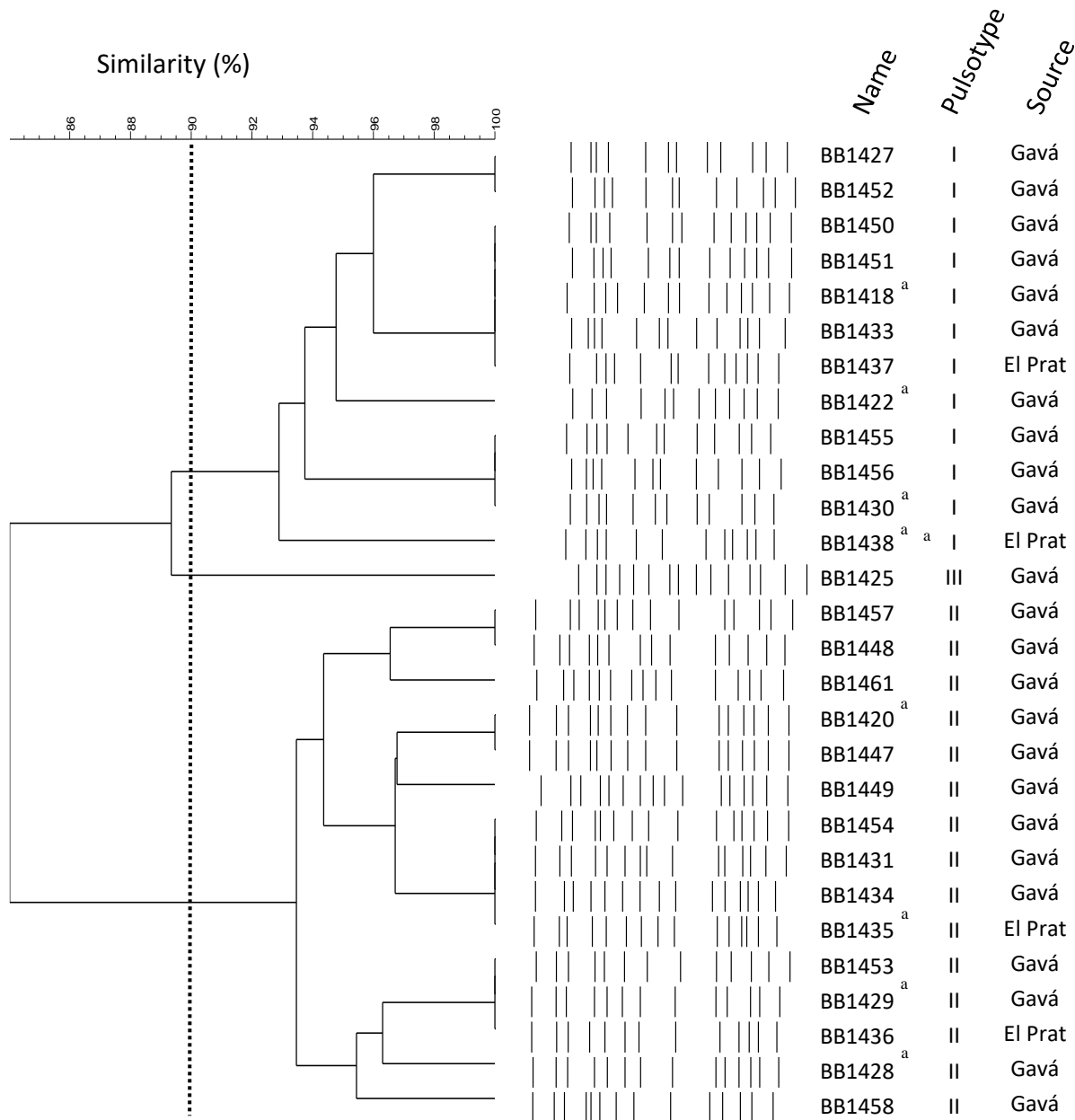


Figura 23. Dendrogram of the 29 *E. coli* positive to *mcr-1*.Dendrogram was constructed with XbaI-PFGE profiles using Bionumerics software (UPGMA cluster analyses based on Dice correlation coefficient, tolerance of 2 and optimization of 1%). A cutoff similarity value up to 90% was used to define clones. ^a Isolates with MLST data.

DISCUSSION

The discovery of new less toxic drugs such as aminoglycosides, led to the restriction of colistin to topical treatments in human medicine while, in veterinary medicine their use was indicated for treatment as well as for the prevention of infections (Catry B *et al.*, 2015). The alarming rise of antibiotic resistance along with the scarcity of new drugs, is resulting in the lack of effective antibiotics (Ventola CL, 2015). As such, colistin has been re-introduced in human medicine as a last resort antibiotic despite its toxicity (Liu YY *et al.*, 2016). Until last year, the only known resistance mechanism to colistin was mediated by chromosomal mutations. As mutational mechanisms of resistance are only transmitted vertically, their dissemination has been more confined (Liu YY *et al.*, 2016). Nevertheless, Liu *et al.* recently described the first plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-1*, which greatly facilitates the propagation of colistin resistance by horizontal gene transfer (Liu YY *et al.*, 2016). Since then, the presence of *mcr-1* has been reported in many different countries, origins and species (Skov RL *et al.*, 2016). Our study highlights the elevated prevalence of *mcr-1* in different bacterial species recovered without colistin selection from sewage water around Barcelona.

Aquatic environments play an important role in the dissemination of antibiotic resistance, acting as a reservoir where phenomena such as acquisition, transmission and genetic evolution of resistance genes are frequent (Marti E *et al.*, 2014). The presence of *mcr-1* in water, and therefore in the environment, not only facilitates the spreading of colistin resistant clones into the population, but also favors the transmission of this gene among different species such as pathogenic *K. pneumoniae*.

Recently, Prim *et al.* have reported this plasmid-mediated colistin resistance in 15 clinical strains of *E. coli* isolated from patients of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona (Prim N *et al.*, 2016) The study underlines the genetic diversity of *mcr-1*-bearing clones in the hospital (Prim N *et al.*, 2016). In our study, the colistin resistance gene was present in two predominant *E. coli* clones, two unique *E. coli* as well as in a *K. pneumoniae*. The predominant pulsotypes were isolated from two WWTP, one (Gavà) serving an area consisting of a number of cities and towns, and a population equivalent of 370,000 inhabitants, and the other (el Prat) which collects the sewage from the south of Barcelona city, corresponding to 2,000,000 inhabitants. Because sewage waters comprise a mixture from numerous individuals, our data provide an optimal representation of what is circulating within the human population. In all isolates positive for *mcr-1*, selected in the absence of colistin, the gene was located on an

Incl2 plasmid conferring resistance exclusively to colistin. Our results support the notion that a plasmid bearing *mcr-1* is circulating among the population of Barcelona predominantly within two clones, and it has been transferred to other *E. coli* as well as to other species such as *K. pneumoniae*.

Surveillance of resistance is essential to mitigate the threat of antimicrobial resistance (CDC, 2013). Because colistin was not used to select the *mcr-1* isolates, our approach allowed detection of a *mcr-1* positive isolate that was nevertheless susceptible to colistin. *mcr-1* was harbored on a plasmid that we were able to transform, conferring then resistance to colistin. Hence, *mcr-1* can act as a silent antimicrobial resistance gene, evading phenotypic detection which causes treatment failure and favors its dissemination (Enne VI *et al.*, 2006; Deekshit VK *et al.*, 2012). The isolate has a different PFGE pattern compared to all the other ones. Thus, the genetic context of *mcr-1*, seems to be responsible for this phenotype. In this sense, we could speculate that either the cell wall structure, or the copy number of the *mcr-1* Incl2 plasmid could be the underlying cause of this phenomenon.

The lack of selective pressure to colistin in the isolation of these bacteria shows the proportion of *mcr-1* containing Enterobacteriaceae in river and sewage water. Absence of *mcr-1* bearing isolates in rivers can be due to i) the lack of colistin treated animals/humans contaminating the rivers in these sites and to ii) the lower enterobacterial density in river water as compared to sewage. Besides the epidemiological observation that shows *mcr-1* positive isolates circulating in the population, the high prevalence of *mcr-1* positive isolates in sewage is a risk factor promoting the dissemination of this resistance mechanism to environmental water and other ecosystems since, sewage treatment processes reduce but not remove completely the antibiotic resistant bacteria from the final effluent (Hendricks R *et al.*, 2012). To safeguard the future of colistin, it is essential to adapt a multidisciplinary “One Health” strategy that should include control measures from the source, regulating use in human and veterinary medicine, to the sewage, improving water treatment protocol



DISCUSIÓN

Imagen: Selman Waksman, Randolph Major y Alexander Fleming discutiendo sobre la técnica *cross-streak* de cribado de antibióticos. Laboratorio de Waksman, Universidad de Rutgers, Nueva Jersey, 1940

DISCUSIÓN

A lo largo de esta tesis doctoral se han identificado y estudiado mecanismos de resistencia frente a antibióticos de gran importancia clínica (bien por ser de uso habitual en el tratamiento de infecciones complicadas, como es el caso de los aminoglucósidos, o bien por ser de las últimas opciones terapéuticas frente a infecciones causadas por microorganismos multirresistentes, como son la colistina o la tigeciclina) presentes en bacterias patógenas de la familia *Enterobacteriaceae*.

Hemos centrado nuestro trabajo en este grupo de bacterias, ya que su asociación con mecanismos de resistencia a antibióticos (como fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación o carbapenemas), las convierte, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en unos de los mayores riesgos para la salud pública, no solo por el aumento de la tasas de mortalidad ante la falta de disponibilidad de antibióticos efectivos, sino también por el enorme impacto en los costes médicos que llevan asociado (WHO, 2014). Todo ello sitúa a la enterobacterias en el foco de atención de la OMS, asignándolas prioridad crítica en la búsqueda de nuevos antibióticos que permitan el tratamiento efectivo para estos microorganismos multirresistentes para los que nos quedamos sin recursos (tabla 14).

Tabla 14. Patógenos considerados por la OMS de prioridad máxima en la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos para combatirlos.

| | | ESPECIES ^a | RESISTENCIAS |
|-----------|-----------|---|---|
| PRIORIDAD | 1 CRÍTICA | <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i> ^a | Carbapenemas Carbapenemas Carbapenemas y cefalosporinas 3ra generación |
| | 2 ALTA | <i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Campylobacter</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Vancomicina Meticilina y vancomicina Claritromicina Fluoroquinolonas Fluoroquinolonas Fluoroquinolonas y cefalosporinas 3ra generación |
| | 3 MEDIA | <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Shigella spp.</i> | Penicilina Ampicilina Fluoroquinolonas |

^a Dentro de *Enterobacteriaceae* se incluyen *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, y *Morganella spp.*

Puesto que las resistencias antimicrobianas no entienden de fronteras, no hemos querido centrar nuestro trabajo exclusivamente en el estudio de la evolución y diseminación de las resistencias en el ámbito humano hospitalario, si no que hemos querido ir más allá, estudiando el papel de los animales de compañía y del medio ambiente, en la selección y propagación de resistencias emergentes que afectan directamente a la salud humana.

1. Origen de la resistencia a tigeciclina en animales de compañía.

En el primero de los trabajos presentados en esta tesis doctoral, caracterizamos dos *K. pneumoniae*, obtenidas a partir de muestras de orina de dos perros, que mostraban fenotipo de resistencia a tigeciclina. Esta es la primera vez que se detectan dos aislados de origen animal con resistencia a tigeciclina. Curiosamente, el mecanismo por el cual resistían a tigeciclina también parece ser novedoso, ya que las bombas responsable de la resistencia a tigeciclina en *K. pneumoniae* (AcrAB) y en *E. coli* (AcrEF) fueron descartadas mediante el análisis de su expresión a través de ensayos de qRT-PCR. El hecho de que el mecanismo de resistencia no sea el convencional identificado en los aislados de origen humano, y que sean los primeros aislados detectados en perros, podía sugerir que el origen de esta resistencia podría estar en los animales. De tal manera que el uso de otros antibióticos, como por ejemplo otras tetraciclinas, podía haber favorecido la sobreexpresión de una bomba de eflujo, no relacionada previamente con la tigeciclina, que por medio del fenómeno de resistencia cruzada confirió resistencia a tigeciclina.

Sin embargo, el perfil alélico de los dos aislados (MLST) reveló que ambas *K. pneumoniae* pertenecían a STs de origen humano, ST11 y ST147. Lo cual hace replantearse su origen, pues también podría haber ocurrido que estas dos *K. pneumoniae* se encontraran en pacientes hospitalizados humanos, que estuvieran recibiendo un tratamiento con tigeciclina. Este contacto con la tigeciclina habría seleccionado una nueva bomba de eflujo capaz de extruirla al exterior celular, y posteriormente estos aislados se hubieran propagado a los perros.

Ambas teorías podrían ser ciertas, puesto que aunque generalmente se relaciona la aparición de resistencia a tigeciclina con el tratamiento directo con tigeciclina, se han descrito casos, tanto *in vivo* como *in vitro*, en donde la resistencia a tigeciclina aparece, o podría aparecer, como resultado de la selección cruzada con otros antibióticos (Hornsey M *et al.*, 2010; Linkevicius M *et al.*, 2015).

2. ¿Estamos ante la presencia de un nuevo mecanismo cromosómico de resistencia a tigeciclina?

En el primero de nuestros trabajos hemos demostrado que los principales mecanismos de resistencia a tigeciclina AcrAB y AcrEF, descritos en *K. pneumoniae* y en *E. coli* respectivamente, no son los responsables de la resistencia a tigeciclina en nuestros aislados. Sin embargo, recientemente se han descrito otras bombas de eflujo en *K. pneumoniae* relacionadas con la extrusión de tigeciclina, por lo que no podemos asegurar que nos encontremos ante un nuevo mecanismo de resistencia, sin descartar la implicación de estas nuevas bombas.

Es cierto, que en los casos donde se describe la participación de la bomba OqxAB en el fenotipo de resistencia a tigeciclina, esta sobreexpresión siempre va acompañada de la sobreexpresión de AcrAB (Zhong X *et al*, 2014). Aunque este hecho no sería suficiente, para descartar la implicación de esta bomba de eflujo en la resistencia a tigeciclina en nuestros aislados. Identificar su presencia y analizar su expresión o la participación del regulador *rarA*, sería interesante para descartar su contribución en la resistencia a tigeciclina de nuestras *K. pneumoniae*.

Por el contrario la bomba de eflujo KpgAB no se ha visto relacionada con la sobreexpresión de AcrAB ni OqxAB, por lo que podría ser un candidato más factible. En este caso la identificación de esta bomba y de la IS5 insertada en la región aguas arriba del operón, acompañada del análisis de los niveles de expresión, serían los pasos a dar para demostrar la implicación de esta bomba en la resistencia a tigeciclina de nuestras cepas.

En cuanto a la localización de nuestra bomba de eflujo, los resultados obtenidos por PFGE tras la digestión con la nucleasa S1, muestran que cada una de las cepas tiene un plásmido de gran tamaño. Solo pudimos transformar y conjugar el plásmido de BB1287, por lo que solo de esa cepa podemos descartar que la bomba de eflujo se encuentre en el plásmido de gran tamaño. Como el plásmido de BB1286 no se pudo transformar o conjugar no podemos asegurar que la bomba no se encuentre codificada en el plásmido. Además hay que tener en cuenta que la técnica de PFGE S1 no sirve para detectar plásmidos de pequeño tamaño por lo que en ningún caso podríamos afirmar que la bomba no se encuentra codificada en plásmidos de pequeño tamaño. Por lo tanto, para poder descartar que la bomba de eflujo estuviera codificada en un plásmido, tendríamos que realizar experimentos de transformación y conjugación utilizando la tigeciclina como antibiótico de selección. Puesto que utilizamos la ampicilina y la amikacina en la selección de transformantes y transconjugantes por los genes que codificaban las cepas.

3. La fosfomicina, el gen silenciado.

Todos los aislados del estudio de la India mostraron sensibilidad a la fosfomicina, excepto una de las cepas, CM27 (CMI 96 µg/ml). Sin embargo, gracias a la secuenciación masiva pudimos identificar la presencia en todas las cepas del gen *fosA*. Este gen de resistencia localizado en plásmidos, codifica una metaloenzima que inactiva la fosfomicina. En nuestros aislados, *fosA* se encontraba en contigs con tamaños próximos a las 300 kb, lo que podría indicar que no se encuentra en plásmidos sino en el cromosoma. El análisis de la secuencia nucleotídica de la región 5'UTR no mostros ninguna cambio significativo entre las cepas sensibles y las cepas resistentes. Además la secuencia aminoacídica de la proteína tampoco mostro ningún cambio sostenido en las cepas sensibles con respecto las resistentes. Es necesario realizar más experimentos para determinar la funcionalidad de este gen. Por ejemplo clonar *fosA* de las WT en un vector con expresión controlada con el fin de determinar si la falta de expresión en nuestras cepas tiene que ver con mutaciones en sus reguladores de expresión. La interrupción de *fosA* en CM27 sería interesante para conocer si la resistencia a fosfomicina en esa cepa esta mediado por *fosA* o por uno de los otros mecanismos de resistencia a fosfomicina que se conocen. Determinar la funcionalida de el gen en estos aislados es de vital importancia, pues si todas las cepas portadoras de *fosA* mediante mutaciones en el gen o en sus reguladores, fácilmente tornan a resistentes, la introducción de fosfomicina en la practica clínica en India proporcionara la presión necesaria para que se lleven a cabo estas mutaciones y de esta manera la fosfomicina rápidamente será un antibiótico ineficaz en el trataeminto de infecciones multirresistentes pues todas las bacterias portaran genes silenciados de resistencia a fosfomicina.

4. *mcr-1*, de las aguas residuales a los ríos.

La presencia de clones portadores de *mcr-1* en las aguas residuales de dos plantas depuradoras de Barcelona es una clara evidencia de la circulación de estos clones entre la población de Barcelona. Como hemos discutido previamente, el tratamiento de las aguas residuales no elimina totalmente la presencia de bacterias del agua por lo que podemos asumir que se están liberando al medio ambiente bacterias portadoras con *mcr1*. Sin embargo estudiar la presencia de estos clones en las aguas depuradas previas a la liberación al medio ambiente sería necesario para confirmar la eliminación de *mcr-1* al medio ambiente. Tambien seria interesante conocer si las aguas residuales de hospitales de la zona vierten directamente a las aguas residuales de la ciudad o se someten a un tratamiento previo. Teninedo en cuenta que

mcr-1 ya se ha identificado en un hospital que pertenece a la zona de recolección de aguas de una de las depuradoras, este estudio nos serviría para determinar si la presencia de *mcr-1* en las aguas residuales esta ligada a la eliminación de los hospitales o si por el contrario estas cepas provienen de individuos sanos que eliminan sus aguas residuales al alcantarillado de la ciudad.

5. Clones multirresistentes, exitosos y epidémicos en la India.

Hemos detectado la presencia de bacterias multirresistentes epidémicas en el hospital Universitario de la India. Además hemos observado que estas bacterias portan plásmidos exitosos multirresistentes. El análisis evolutivo de las bacterias y los plásmidos nos sugieren que uno de los clones se introdujo con anterioridad en el hospital, y su plásmido ha empezado a evolucionar adquiriendo genes de resistencia de tal manera que el plásmido con mayor cantidad de genes de resistencia prevalece sobre el plásmido que presenta un mobiloma más pobre. El otro clon prevalente parece más nuevo ya que tanto la bacteria como el plásmido presentan muy pocas variaciones, sin embargo pese a q apenas ha evolucionado rápidamente se ha diseminado por todo el hospital lo cual nos indica que las medidas de contención o de higiene son deficientes y favorecen rápidamente la diseminación de las bacterias entre distintos departamentos hospitalarios. Por otro lado también hemos detectado un plásmido que ha sido capaz de transmitirse entre bacterias de distintos grupos clonales. Además este plásmido ha sido identificado en *Enterobacter cloacae* de un paciente en Australia que recientemente había viajado a la zona del norte de India, justo donde está localizado nuestro hospital (Wailan AM *et al.*, 2016). Este hecho podría suponer que estos plásmidos no solo se encuentran localizados en nuestro hospital, sino que son clones que se encuentran en la población

6. Problemas en la detección de genes de resistencia.

En el caso de *mcr-1* no encontramos con el demostrado problema de que uno de los aislados que portaba *mcr-1* era sensible a colistina. Sin embargo cuando lo transformamos su transformante si tenía fenotipo de resistencia a colistina. Sería interesante conocer cual o cuales son los mecanismos responsables de esta silenciación genética. Ya que el hecho de tener un gen silente pero con alta capacidad de transmutarse y ser funcional, favorece la diseminación de la resistencia sin embargo a la cepa portadora no le aporta ningún beneficio.

Al igual ocurre con el gen *fosA* encontrado en las cepas de la India. En este caso no hemos demostrado su funcionalidad, pero su estructura en nucleótidos y aminoácidos es similar

a las estructuras de *fosA* funcionales de otros estudios. La presencia y diseminación de genes de resistencia silentes suponen incrementar la reserva de genes resistencias en las bacterias, de tal manera que estos genes en el futuro podrían ser expresados y ser útiles para el microorganismo.



CONCLUSIONES

Imagen: Alexander Fleming examinando una placa petri con crecimiento bacteriano.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta tesis doctoral son:

Primera. Hemos identificado por primera vez dos aislados clínicos procedentes de animales de compañía que presentaban altos niveles de resistencia a tigeciclina, un antibiótico de uso exclusivo en hospitales de medicina humana. La presencia de bacterias resistentes a tigeciclina en este tipo de animales, que tienen un estrecho contacto con el ser humano, supone una nueva y fácil vía de diseminación para este determinante de resistencia.

Segunda. Hemos demostrado que el principal mecanismo de resistencia a tigeciclina en *K. pneumoniae* a través de la sobreexpresión de la bomba de eflujo AcrAB-TolC, no es el responsable de la resistencia a tigeciclina en nuestros aislados de origen animal. Nuestros resultados sugieren que podríamos estar ante la presencia de un nuevo mecanismo de resistencia a tigeciclina.

Tercera. Hemos observado una alta prevalencia de la asociación de carbapenemasas como *bla*NDM-1 con metilasas del 16S ARNr en aislados clínicos procedentes del hospital universitario de Lucknow, India. Entre estos aislados hemos identificado dos clones exitosos, multirresistentes y epidémicos que se distribuían por todos los departamentos del hospital. El estudio del plasmidoma relacionado con metilasas, nos reveló la presencia de tres plásmidos predominantes y su evolución hacia la multirresistencia.

Cuarta. La fosfomicina es un antibiótico cuyo uso, hasta el momento, no se ha autorizado en India y por tanto se propone como una buena alternativa en el tratamiento de infecciones multirresistentes en este país ya que sus niveles de resistencia se mantienen bajos. Nuestros aislados a pesar de ser predominantemente sensibles portan el gen de resistencia a fosfomicina *fosA*. Estos resultados apuntan a que el uso de la fosfomicina podría ejercer la presión necesaria

para revertir fácilmente la sensibilidad de los aislados, conduciendo rápidamente a la ineficiencia de la fosfomicina.

Quinta. El primer gen de resistencia a colistina movilizable mediante plásmidos, *mcr-1*, está presente en 30 aislados procedentes de aguas residuales obtenidas de dos plantas depuradoras en Barcelona, lo cual implica que *mcr-1* está circulando, principalmente a través de dos clones *E. coli*, entre la población sana.

Sexta. *mcr-1* no siempre va asociado a un fenotipo de resistencia pese a que sea un gen funcional. Este hecho debe tenerse en cuenta a la hora de desarrollar técnicas de detección.

Séptima. Los resultados de esta tesis doctoral, sirven para establecer medidas de control de la diseminación de las resistencias antimicrobianas y en última instancia, predecir la emergencia de nuevos mecanismos de resistencia y sus vías de propagación.

CONCLUSIONS

The conclusions for this doctoral thesis are:

First. We have identified the first two clinical isolates obtained from domestic animals with high resistance level to tigecycline, a human-medicine-only antibiotic for hospital use. The presence of tigecycline resistant bacteria in these types of animals, which have a close contact with humans, reveals a new and easy way of dissemination for this resistance determinant.

Second. We have demonstrated that the main resistance mechanism of tigecycline in *K. pneumoniae*, through overexpression of the AcrAB-TolC efflux pump, is not the responsible for the resistance in our animal-origin isolates.

Third. We have observed a high prevalence of the association between carbapenemases, like blaNDM-1, and 16S rRNA methyltransferases in clinical isolates from human samples of the university hospital at Lucknow, India. We identified two epidemic, successful and multiresistant *E. coli* clones distributed throughout the hospital. The characterization of the plasmidome related with methylases, revealed the presence of three predominant plasmids and their evolution towards multiresistance.

Fourth. Fosfomycin is an antibiotic which, up until now, has not been authorized for its use in India. It is therefore proposed as a good alternative for the treatment of multi-resistant infections in this country, since its resistance levels are kept low. Our isolates, although predominantly sensitive, carried the resistance gene to fosfomycin *fosA*. The results point out that the use of fosfomycin might be enough to easily revert the isolate's sensitivity, quickly rendering fosfomycin inefficient.

Fifth. The first mobile colistin resistance gene located in plasmid (*mcr-1*), was identified in 30 isolates obtained from sewage water, sampled from two water treatment plants in Barcelona.

This implies that *mcr-1* is circulating, mainly through two *E. coli* clones, among the healthy population.

Sixth. *mcr-1* is not always associated to a resistance phenotype, even when it is a functional gene. This fact must be taken into account when developing detection techniques.

Seventh. The results of this doctoral thesis may be used towards the elaboration of control measures of the antimicrobial resistance dissemination, and ultimately, predict the appearance of new resistance mechanisms, and the new pathways involved in their dissemination.

KEEP THEM OUT!

CRD
AIR SAC
SINUSITIS
NONSPECIFIC ENTERITIS
BLUE COMB



Follow this preventive program

Continuous HIGH LEVEL feeding of
AUREOMYCIN*
CHLORTETRACYCLINE

**"Much less disease...particularly
AIR SAC and ENTERITIS...
with HIGH LEVELS of AUREOMYCIN"**

These are the words of a large broiler producer in the Delmarva area. The comparison figures below show the results from old flocks before AUREOMYCIN was fed . . . and the results from new flocks after AUREOMYCIN was fed continuously at 50 grams per ton of feed.

| | Before AUREOMYCIN | After AUREOMYCIN |
|---|----------------------|---------------------|
| No. flocks | 25 | 18 |
| No. birds started | 234,300 | 129,000 |
| Mortality (%) | 9.6 | 5.7 |
| Av. Market Wt. | 3.19 (lb.) | 3.49 (lb.) |
| Feed per lb. of gain | 2.24 (lb.) | 3.03 (lb.) |
| Total market wt. per 1000 birds started | 2,862 (lb.) | 3,280 (lb.) |

NET RETURN per 1000 birds started (figured on a 25¢ market)

EXTRA PROFIT, including cost of AUREOMYCIN, per 1000 birds started

\$119
\$55

Why wait until disease has caused weight losses, poor egg production, feed waste, culls and dead birds? Feed AUREOMYCIN Chlorotetracycline to chickens and turkeys continuously at HIGH LEVELS and prevent these losses! Give them internal sanitation with the antibiotic that knocks out MORE disease-producing germs!

Many poultrymen have already discovered that this new, preventive program is more profitable! They've compared feeding costs and profits of the new program with their former program . . . and seen the remarkable results obtained with continuous HIGH LEVELS of AUREOMYCIN. More birds saved! Heavier, top-quality meat birds! More eggs to sell . . . premiums for extra hatchability! Better feed conversion! And PROFITS . . . several times higher!

Talk to your feed dealer or feed mixer. He can advise you on the program of HIGH LEVEL AUREOMYCIN that best suits your needs.

* Trade Mark

For Details

AMERICAN CROSSLAND COMPANY

Fine Chemicals Division

30 Rockefeller Plaza

New York 20, N. Y.

ANEXOS

Imagen: Anuncio que promueve el uso de la clortetraciclina como aditivo en alimentación animal, 1951.

PUBLICACIONES

I. *Klebsiella pneumoniae* ST11 and ST147 highly resistant to tigecycline from companion animals

Trabajo publicado en "*Antimicrobials Agents and Chemotherapy*" Factor de impacto:
4,415 (2015)

AAC Accepted Manuscript Posted Online 10 April 2017
 Antimicrob. Agents Chemother. doi:10.1128/AAC.02640-16
 Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

- 1 *Klebsiella pneumoniae* ST11 and ST147 highly resistant to tigecycline from companion
- 2 animals
- 3
- 4
- 5 Cristina M. Ovejero,^a Jose Antonio Escudero,^a Daniel Thomas-Lopez,^a Andreas Hoefer,^a
- 6 Gabriel Moyano,^a Natalia Montero,^a Carmen Martin Espada,^{a,b} Bruno Gonzalez-Zorn^{a,#}
- 7
- 8 Department of Animal Health and Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria, Universidad
- 9 Complutense de Madrid, Madrid, Spain^a
- 10 Hospital Clínico Veterinario, Universidad Complutense de Madrid, Spain^b
- 11
- 12 Running Head: Tigecycline resistant *K. pneumoniae* from pets in Spain
- 13
- 14 #Address correspondence to Bruno Gonzalez-Zorn, bgzorn@ucm.es
- 15

16 **Abstract**

17 In this study we have characterized two tigecycline resistant *Klebsiella pneumoniae* clones
18 isolated from dog urine samples. The isolates were genetically unrelated, belonging to
19 sequence types ST11 and ST147, both classically related to human isolates. To the best of
20 our knowledge, this is the first identification of tigecycline resistant isolates from animals.
21 We unveil the worrisome circulation among animals of bacterial clones resistant to this last
22 resort antibiotic.

23

24 **Text**

25 Circulation of resistant bacteria among animals is a concern for public health, since animals
26 can act as reservoirs, facilitating their maintenance, evolution and spread (1, 2). The
27 emergence of carbapenem-resistant bacteria has dramatically hindered therapeutic options
28 (3). Given that such resistance is commonly associated with fluoroquinolone or
29 aminoglycoside resistance, antibiotic therapy is often limited to older antibiotics such as
30 colistin or last-resort molecules such as tigecycline (4, 5). In the last years, the appearance
31 of tigecycline resistant Gram negative bacteria has increased, generally as a consequence of
32 its use in the treatment of hospitalized patients (6). Tigecycline resistance in *K. pneumoniae*
33 has been associated to the overexpression of AcrAB-TolC, a multisubstrate efflux pump
34 belonging to the resistance-nodulation-division (RND) superfamily (6-9).

35 In the present study we characterized two tigecycline-resistant *Klebsiella pneumoniae*
36 isolates (BB1286 and BB1287) identified in July 2010 from two different dog urine
37 samples in the Hospital Clínico Veterinario Complutense. BB1287 was isolated from a dog
38 with a cervical disc herniation which was catheterized to facilitate urination. Then the dog
39 developed a urinary tract infection. The sample was obtained by bladder tap using
40 ultrasound guidance. BB1286 was obtained from an outpatient, and no further clinical data
41 were available. A complete antibiogram profile, using broth microdilution in commercial
42 microtiter plates (Sensititre EUMVS2) or in house microtiter plates, was performed and
43 interpreted according to the EUCAST guidelines for Enterobacteriaceae (10). The results
44 showed a multiresistant phenotype including resistance to tigecycline (MIC > 4 mg/L)
45 (Table 2). Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis (11) showed that the two *K.*
46 *pneumoniae* isolates were not genetically related. This result was further confirmed by

47 MLST analysis (11), which showed that both isolates belonged to sequence types related
48 with human clones. BB1286 belonged to the hyper-epidemic successful clone ST11 and
49 BB1287 to the more recent ST147 (12-15).

50 Plasmid content was analyzed by S1-PFGE (16) showing that BB1286 carried a plasmid of
51 approximately 194 kbp, whereas BB1287 bore a 145 kbp-long replicon. The latter could be
52 transformed and conjugated (frequency of conjugation 1.78×10^{-6}) (figure S1). The
53 conjugated plasmid conferred resistance to multiple antibiotics (Table 2) and was classified
54 according to a PCR-based replicon typing protocol (17) as belonging to the IncA/C
55 incompatibility group, which is widely distributed among human and animal
56 *Enterobacteriaceae* (18, 19).

57 In order to characterize the plasmid-borne antibiotic resistance determinants, wild-type,
58 transformant and transconjugant strains were screened using conventional PCR for the main
59 beta-lactamases, fluoroquinolone- and tetracycline-resistance genes, and sequenced using
60 primers listed in Table 1. BB1286 harbored the ESBL *bla*_{SHV-11}, *tetA* and *qnrB4* genes
61 whereas BB1287 carried the ESBLs *bla*_{CMY-2} and *bla*_{SHV-11} and *tetA* gene. Transformant
62 BB1287tf and transconjugant BB1287tc only harbored *bla*_{CMY-2} and *tetA* genes.

63 To assess the involvement of efflux pumps in the tigecycline resistance phenotype, MICs
64 with and without the efflux pump inhibitor phenyl-arginine- β -naphthylamide
65 dihydrochloride (PA β N) (75 nM) were performed. A decrease in tigecycline resistance in
66 the presence of PA β N was observed in both cases (Table 2). This reduction was indicative
67 of tigecycline efflux in these strains. To assess the role of the AcrAB-TolC multi-drug
68 resistance transporter in tigecycline resistance in our isolates, qRT-PCR was performed

(20) to determine the levels of expression of this pump. As controls, tigecycline susceptible *K. pneumoniae* strains ATCC 10300 and BB1097, a clinical isolate obtained from the same hospital during the same time period, were used. Expression levels of *acrA* were not significantly different between BB1286, BB1287 and the control strains (Figure 1). Accordingly, no mutations potentially related to the resistance phenotype were identified in *acrAB*, nor in its regulome, *acrR*, *marA*, *marR* (*marA* repressor), *ramA*, *ramR* (*ramA* repressor), *soxS*, *soxR* (*soxS* repressor) when comparing tigecycline resistant and susceptible strains. Therefore, the expression of AcrEF, another RND efflux system known to transport tigecycline in *E. coli*, was determined (21). Expression levels *acrF* were low in all strains and no significant differences were observed between resistant and sensitive strains (Figure 1).

To the best of our knowledge, this is the first identification of tigecycline resistant bacteria isolated from companion animals. Interestingly, MLST confirmed that BB1286 and BB1287 belong to the human-related sequence types ST11 and ST147 respectively. ST11 is considered as an important hyper-epidemic nosocomial human clone distributed worldwide and associated to the dissemination of ESBLs, aminoglycoside resistance mediated 16S rRNA methylase genes as well as carbapenemases (11, 13, 22). Moreover, ST11 is emerging in animals: since its first detection in dogs (11) it has been identified in other companion animals (23, 24) and recently in wild animals (25, 26). On the contrary, ST147 is a newer and emergent human-related sequence type, associated with multidrug and even extensive drug-resistant human isolates, but not found in animals (22, 27, 28).

It is widely known that the use of antibiotics in food-producing animals, both as therapeutic agents and growth promoters, contributes to the selection of resistant strains,

5

92 which can be transmitted to human directly or indirectly through food chain or animal
93 waste release to the environment (29). For this reason many experts have strived to
94 establish global policies aiming to restrict antimicrobial use in food-producing animals.
95 Nevertheless the use of antibiotics in cats and dogs is not as regulated, despite the close
96 contact with owners and the fact that they are treated with the same antibiotics than humans
97 (30, 31). Here, we show that tigecycline resistance in BB1286 and BB1287 is likely due to
98 a chromosomal efflux pump. We assessed the involvement of AcrAB, the main tigecycline
99 efflux pump in *K. pneumoniae*, and its homologous AcrEF which in *E. coli* is also
100 associated with tigecycline resistance. Interestingly, our results point out that neither
101 AcrAB nor AcrEF were responsible for tigecycline resistance in our isolates, suggesting the
102 involvement of a novel determinant. Further experiments are needed to elucidate the
103 genetic basis of this mechanism.

104 Our findings are relevant for two reasons: first, they show the adaptation of human clones
105 to animals, increasing the spread of resistance mechanisms against one of the last
106 therapeutic options for complicated infections in humans. Second, the transmission of
107 resistant bacteria between humans and pets underscores the importance of the role of
108 veterinarians. These must try to minimize the development of resistance also in companion
109 animals to preserve last-line human antimicrobials.

110

111 **Funding section**

112 This study was supported by EU projects EvoTAR 282004-FP7 and EFFORT 613754-FP7.

113 JAE is supported by the Marie Curie Intra-European Fellowship for Career Development

114 (FP-7-PEOPLE-2011-IEF, ICADIGE) and by the 2016-T1/BIO-1105 project of the
115 *Atracción de Talento* Program of the *Comunidad de Madrid*.

116 **Transparency declarations**

117 CMO and JAE designed the study, performed the experiments, analyzed and interpreted the
118 results and wrote the draft manuscript. CME collected the samples, provided the isolates for
119 this study and revised and approved the final version of the manuscript. NM performed the
120 experiments, DTL and GM analyzed and interpreted the results and AH revised the
121 manuscript. BGZ conceived, designed and coordinated the study and revised and approved
122 the final version of the manuscript.

123

124 REFERENCES

- 125 1. Labro MT, Bryskier JM. 2014. Antibacterial resistance: an emerging 'zoonosis'? *Expert Rev*
- 126 *Anti Infect Ther* 12:1441-61.
- 127 2. Rubin JE, Pitout JD. 2014. Extended-spectrum β -lactamase, carbapenemase and AmpC
- 128 producing Enterobacteriaceae in companion animals. *Vet Microbiol* 170:10-8.
- 129 3. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G,
- 130 Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann
- 131 P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. 2013.
- 132 Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases.
- 133 *Lancet Infectious Diseases* 13:785-796.
- 134 4. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. 2008.
- 135 Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing
- 136 Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 14:144-153.
- 137 5. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. 2009. Extended-spectrum beta-lactamase-producing
- 138 organisms. *Journal of Hospital Infection* 73:345-354.
- 139 6. Sun Y, Cai Y, Liu X, Bai N, Liang BB, Wang R. 2013. The emergence of clinical resistance to
- 140 tigecycline. *International Journal of Antimicrobial Agents* 41:110-116.
- 141 7. Hentschke M, Wolters M, Sobottka I, Rohde H, Aepfelbacher M. 2010. *ramR* Mutations in
- 142 Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* with Reduced Susceptibility to Tigecycline.
- 143 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54:2720-2723.
- 144 8. Ruzin A, Visalli MA, Keeney D, Bradford PA. 2005. Influence of transcriptional activator
- 145 *RamA* on expression of multidrug efflux pump *AcrAB* and tigecycline susceptibility in
- 146 *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:1017-1022.
- 147 9. Ruzin A, Immermann FW, Bradford PA. 2008. Real-time PCR and statistical analyses of
- 148 *acrAB* and *ramA* expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial*
- 149 *Agents and Chemotherapy* 52:3430-3432.
- 150 10. Anonymous. 2016. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
- 151 Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0.
- 152 11. Hidalgo L, Gutierrez B, Ovejero CM, Carrilero L, Matrat S, Saba CKS, Santos-Lopez A,
- 153 Thomas-Lopez D, Hoefer A, Suarez M, Santurde G, Martin-Espada C, Gonzalez-Zorn B.
- 154 2013. *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 11 from Companion Animals Bearing *ArmA*
- 155 *Methyltransferase*, *DHA-1* beta-Lactamase, and *QnrB4*. *Antimicrobial Agents and*
- 156 *Chemotherapy* 57:4532-4534.
- 157 12. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Climaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues
- 158 F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F,
- 159 Canton R, da Costa Darini AL, Coque TM. 2011. Dissemination of *bla*(KPC-2) by the Spread
- 160 of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids
- 161 (*IncFII*, *IncN*, *IncL/M*) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. *Antimicrobial Agents*
- 162 *and Chemotherapy* 55:3579-3583.
- 163 13. Andrade LN, Vitali L, Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Martinez R, Darini AL. 2014.
- 164 Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant),
- 165 *QnrS1*-, *CTX-M-2*-, and *KPC-2*-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-
- 166 risk clone. *J Clin Microbiol* 52:2530-5.
- 167 14. Kocsis B, Kocsis E, Fontana R, Cornaglia G, Mazzariol A. 2013. Identification of *bla*LAP-2 and
- 168 *qnrS1* genes in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST147 clone. *J Med*
- 169 *Microbiol* 62:269-73.

- 170 15. Rodrigues C, Machado E, Ramos H, Peixe L, Novais Â. 2014. Expansion of ESBL-producing
171 *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones
172 (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK). *Int J Med Microbiol* 304:1100-
173 8.
- 174 16. Hidalgo L, Hopkins KL, Wareham DW, Gutierrez B, González-Zorn B. 2012. Association of
175 extended-spectrum β -lactamase VEB-5 and 16S rRNA methyltransferase armA in
176 *Salmonella enterica* from the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 56:4985-7.
- 177 17. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. 2005. Identification of
178 plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods* 63:219-228.
- 179 18. Johnson TJ, Lang KS. 2012. IncA/C plasmids: An emerging threat to human and animal
180 health? *Mob Genet Elements* 2:55-58.
- 181 19. Carattoli A. 2013. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 303:298-304.
- 182 20. Escudero JA, San Millan A, Gutierrez B, Hidalgo L, La Ragione RM, AbuOun M, Galimand M,
183 Ferrándiz MJ, Domínguez L, de la Campa AG, Gonzalez-Zorn B. 2011. Fluoroquinolone
184 efflux in *Streptococcus suis* is mediated by SatAB and not by SmrA. *Antimicrob Agents*
185 *Chemother* 55:5850-60.
- 186 21. Hirata T, Saito A, Nishino K, Tamura N, Yamaguchi A. 2004. Effects of efflux transporter
187 genes on susceptibility of *Escheichia coli* to tigecycline (GAR-936). *Antimicrobial Agents*
188 *and Chemotherapy* 48:2179-2184.
- 189 22. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JD. 2013. Surveillance and molecular
190 epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report
191 of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 57:130-6.
- 192 23. Donati V, Feltrin F, Hendriksen RS, Svendsen CA, Cordaro G, García-Fernández A,
193 Lorenzetti S, Lorenzetti R, Battisti A, Franco A. 2014. Extended-spectrum-beta-lactamases,
194 AmpC beta-lactamases and plasmid mediated quinolone resistance in *klebsiella* spp. from
195 companion animals in Italy. *PLoS One* 9:e90564.
- 196 24. Wohlwend N, Endimiani A, Francey T, Perreten V. 2015. Third-generation-cephalosporin-
197 resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from humans and companion animals in
198 Switzerland: spread of a DHA-producing sequence type 11 clone in a veterinary setting.
199 *Antimicrob Agents Chemother* 59:2949-55.
- 200 25. Pilo P, Vogt D, Origgi FC, Endimiani A, Peterson S, Perreten V. 2015. First report of a
201 multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 11 causing sepsis in a free-
202 ranging beaver (*Castor fiber*). *Environ Microbiol Rep* 7:351-3.
- 203 26. Loncaric I, Beiglböck C, Feßler AT, Posautz A, Rosengarten R, Walzer C, Ehrlich R, Monecke
204 S, Schwarz S, Spengler J, Kübber-Heiss A. 2016. Characterization of ESBL- and AmpC-
205 Producing and Fluoroquinolone-Resistant Enterobacteriaceae Isolated from Mouflons
206 (*Ovis orientalis musimon*) in Austria and Germany. *PLoS One* 11:e0155786.
- 207 27. Guo L, An J, Ma Y, Ye L, Luo Y, Tao C, Yang J. 2016. Nosocomial Outbreak of OXA-48-
208 Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese Hospital: Clonal Transmission of ST147 and
209 ST383. *PLoS One* 11:e0160754.
- 210 28. Galani I, Anagnostoulis G, Chatzikonstantinou M, Petrikos G, Souli M. 2016. Emergence of
211 *Klebsiella pneumoniae* co-producing OXA-48, CTX-M-15, and ArmA in Greece. *Clin*
212 *Microbiol Infect*.
- 213 29. Marshall BM, Levy SB. 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health.
214 *Clin Microbiol Rev* 24:718-33.
- 215 30. Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-
216 resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54:321-332.

- 217 31. Lloyd DH. 2007. Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. *Clinical Infectious*
218 *Diseases* 45:S148-S152.
- 219 32. Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, Liebana E.
220 2005. bla(CTX-M) genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England
221 and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:1319-1322.
- 222 33. Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. 2010. Development of a set of multiplex
223 PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in
224 Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65:490-495.
- 225 34. Saenz Y, Brinas L, Dominguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. 2004. Mechanisms of
226 resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and
227 food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:3996-4001.
- 228 35. Molerés J, Santos-López A, Lázaro I, Labairu J, Prat C, Ardanuy C, González-Zorn B, Aragon
229 V, Garmendia J. 2015. Novel blaROB-1-bearing plasmid conferring resistance to β -lactams
230 in *Haemophilus parasuis* isolates from healthy weaning pigs. *Appl Environ Microbiol*
231 81:3255-67.
- 232

TABLE 1. List of primers used in this study.

| Primer | Sequence 5'→3' | Reference |
|------------------------------|----------------------------------|-----------|
| Amplification and sequencing | | |
| acrRAB -28-9 | AAAAATTACGCCCATCCGC | This work |
| acrRAB 710-691 | GCTATGGTACATACATTAC | This work |
| acrRAB 1072-1091 | TGTATCAGATCGATCCAGCC | This work |
| acrRAB 1194-1175 | CCAACAGTTTCTGATAACGC | This work |
| acrRAB 2181-2200 | GCAGAACACCGTAACTCAGG | This work |
| acrRAB 2307-2288 | ATCGGTACCGGATTCGAAGG | This work |
| acrRAB 3311-3330 | ATCGATGGGACAGATTCAGG | This work |
| acrRAB 3441-3422 | CGCGGAAACGATAGTGATGG | This work |
| acrRAB 4472-4491 | TCTGCCGCTACTGGAAATCC | This work |
| acrRAB 4609-4590 | CGCTCCTGATAAGACATCCC | This work |
| acrRAB 4902-4921 | CTTGAAGCAGTACGTATGCG | This work |
| acrRAB 5187-5168 | GTAGCGGCCTTTGTTTCAGG | This work |
| ramA F | GGATGAACCGTATCAACG | This work |
| ramA R | CCATTGAGTATCTGGTGC | This work |
| ramR F | TGCCCGGTGAACCTGGCGT | (7) |
| ramR R | ATTGCTGATTACGACGCGAC | (7) |
| marRA F | ATAAAGAGTGACCCACATCG | This work |
| marRA R | TGCGGCAGCGAATAGTTTCA | This work |
| soxSR F | ATGCAGTGGTTAGCCAATGC | This work |
| soxSR R | TAGTGAGGAAAAAGCGACGG | This work |
| qRT-PCR | | |
| acrA F | GGCAAAACATGGATCAACTG | This work |
| acrA R | GGCGGTATCGTAGTCTTG | This work |
| acrF F | CCCATTTGACGGTGAAAC | This work |
| acrF R | ACTGCCITGATCGTATCC | This work |
| rpoB F | ATAATGGCTTCCTTGAGAC | This work |
| rpoB R | GATAGCAGACAGGTACTG | This work |
| Resistant determinants | | |
| CTX-M universal F | CGATGTGCAGTACCAGTAA | (32) |
| CTX-M universal R | TTAGTGACCAGAATCAGCGG | (32) |
| MulticaseCIT_for | CGAAGAGGCAATGACCAGAC | (33) |
| MulticaseCIT_rev | ACGGACAGGGTTAGGTAGY ^b | (33) |
| TetA-F | GTAATTCTGAGCACTGTCGC | (34) |
| TetA-R | CTGCCTGGACAACATTGCTT | (34) |
| TetB-F | ACGTTACTCGATGCCAT | (35) |
| TetB-R | AGCACTTGCTCTCTGTT | (35) |
| TetC-F | TCTAACAAATGCGCTCATCGT | (34) |
| TetC-R | GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC | (34) |

^a Restriction sites are underline.

Y^b= T or C.

236

TABLE 2. MIC of strains from this study against several antibiotics.

| | MIC (mg/L) | | | | | |
|--------------------------|------------|--------|---------|----------|---------|----------|
| | BB1286 | BB1287 | INVaF' | BB1287tf | BB1076 | BB1287tc |
| Sulfamethoxazole | > 1024 | > 1024 | <8 | > 1024 | <8 | > 1024 |
| Gentamicin | 0.5 | 32 | 1 | 32 | > 32 | > 32 |
| Ampicillin | 128 | 512 | 4 | 256 | 8 | 256 |
| Cefotaxime | 0.12 | 4 | 0.25 | > 4 | 0.12 | 4 |
| Ceftazidime | 0.5 | 16 | 0.5 | > 16 | <0.25 | 16 |
| Tetracycline | > 64 | > 64 | <1 | 32 | <1 | 64 |
| Streptomycin | 16 | > 128 | > 128 | > 128 | 8 | > 128 |
| Chloramphenicol | > 64 | > 64 | <2 | 64 | 4 | > 64 |
| Florfenicol | 32 | 64 | <2 | 16 | 4 | 32 |
| Kanamycin | > 128 | > 128 | <4 | > 128 | > 128 | > 128 |
| Ciprofloxacin | > 8 | > 8 | < 0.008 | < 0.008 | 0.03 | 0.03 |
| Nalidixic Acid | > 64 | > 64 | < 4 | < 4 | < 4 | < 4 |
| Trimethoprim | 32 | 2 | < 0.5 | < 0.5 | < 0.5 | < 0.5 |
| Colistin | < 2 | < 2 | < 2 | < 2 | < 2 | < 2 |
| Aztreonam ^a | 0.25 | 8 | 0.25 | 8 | < 0.125 | 8 |
| Imipenem ^a | 0.5 | 0.5 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.5 |
| Tigecycline ^a | 6 | 4 | < 0.025 | < 0.025 | < 0.025 | < 0.025 |
| Tigecycline-PAβN (75nM) | 1.5 | 0.25 | - | - | - | - |

237 ^a in-house microtiter plates.

238

II. Spread of *mcr-1*-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain

Trabajo publicado en "*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*" Factor de impacto: 4,919 (2015)

Spread of *mcr-1*-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain

C. M. Ovejero^{1†}, J. F. Delgado-Blas^{1†}, W. Calero-Caceres², M. Muniesa² and B. Gonzalez-Zorn^{1*}

¹Department of Animal Health and VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain;

²Department of Microbiology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-91-3943707; Fax: +34-91-3943908; E-mail: bgzorn@ucm.es

†C. M. O. and J. F. D.-B. contributed equally to this work.

Received 20 June 2016; returned 16 July 2016; revised 2 November 2016; accepted 11 November 2016

Objectives: The mobile colistin resistance gene *mcr-1* has been identified worldwide in human and animal sources, while its occurrence in the environment is still largely unknown. The aim of this study was to investigate the presence of *mcr-1*-harbouring Enterobacteriaceae in water samples obtained from rivers and waste water treatment plants in the area of Barcelona, Spain.

Methods: The presence of *mcr-1* was detected by PCR. Bacterial identification was performed via MALDI-TOF MS. Resistance to colistin was determined by a broth dilution method. The epidemiological relationship between the positive isolates was assessed with PFGE and ST was determined by MLST. Plasmid characterization was performed by transformation experiments, antimicrobial susceptibility testing and incompatibility group PCR.

Results: Thirty MDR isolates bearing *mcr-1*, 29 *Escherichia coli* (ST632 and ST479) and 1 *Klebsiella pneumoniae* (ST526), were identified in sewage from two different waste water treatment plants, whereas the gene was not found in river water. All isolates, including the *K. pneumoniae*, harboured *bla*_{CTX-M-55} and *bla*_{TEM-1}. *mcr-1* was in all cases associated with an Inc12 plasmid, which only conferred resistance to colistin. *mcr-1* was harboured by two predominant *E. coli* clones that were found in both waste water treatment plants.

Conclusions: This study showed a high occurrence of *mcr-1* in the sewage of Barcelona, mainly due to the dissemination of two *E. coli* pulsotypes that are circulating in the population. The presence of *mcr-1* in the environment is a cause for concern, and suggests high prevalence of *mcr-1* in the community.

Introduction

Since its discovery in 1949, colistin (polymyxin E) has been widely used in veterinary medicine, while its application in humans was restricted due to its toxicity.¹ However, as a consequence of the emergence of XDR bacteria, colistin has become a last-resort therapeutic agent against life-threatening infections.²

After the first identification of *mcr-1*, the unique transferable resistance mechanism to colistin in China by Liu *et al.*,³ this gene has been described in Enterobacteriaceae from both humans and animals (livestock and food) worldwide.⁴ However, it has only been detected in two *Escherichia coli* isolates from environmental sources in Switzerland and Malaysia.^{5,6}

In this work, we identified a high occurrence of *mcr-1* in Enterobacteriaceae present in sewage water in Barcelona, Spain.

Materials and methods

Bacterial isolation

The samples were collected from July to November 2013 from river and sewage water in the area of Barcelona. Eight samples were taken from two Spanish rivers, the Cardener and the Llobregat. From each river, samples were taken from water (three samples) and sediments (one sample) at two locations and different dates. For analysis, 10 mL of river water was filtered through a cellulose membrane (0.45 µm pore size), after which the filter was placed on MacConkey agar plates (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) without colistin antibiotic pressure. Likewise, 5 g of sediment from each river was homogenized 1/10 in PBS, centrifuged for 5 min at 300 g and the resulting supernatant was then plated onto MacConkey agar without colistin. Five sewage samples were obtained at different dates from two waste water treatment plants (WWTPs) located in Baix Llobregat; three samples were obtained from El Prat and two samples were obtained from Gavá. Samples

were 10-fold diluted in PBS and plated onto MacConkey agar without colistin. Up to 10 lactose-positive colonies from each sampling site and date were analysed, to avoid repetitive isolation of the same clone. From all these, finally 90 isolates from sewage and 105 from river, distributed from different sites and dates, were used for this study.

Bacterial identification, PCR and susceptibility testing

The bacterial species were subsequently identified via MALDI-TOF MS (VISAVET, Madrid, Spain). The presence of the *mcr-1* gene was detected via PCR from each colony as described by Liu et al.³ These primers amplified both *mcr-1* and *mcr-1.2*.⁷ The antibiotic resistance level was assessed by MIC using commercial Sensititre EUVSEC plates (Trek Diagnostics Inc., Westlake, OH, USA). The results were interpreted following the EUCAST guidelines for Enterobacteriaceae.⁸ Multiplex PCR was performed for the detection of ESBLs and plasmid-mediated AmpC β -lactamases as previously described.⁹

Strain typing

The clonal relatedness of the *mcr-1*-positive isolates was determined via PFGE as previously described.¹⁰ Briefly, DNA plugs were digested using XbaI restriction enzyme (Takara Bio Inc., Japan) for 14 h. PFGE was undertaken on a CHEF-DR III (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the following parameters: running time 22 h, temperature 14°C, field strength 6 V/cm², angles 120°, initial pulse time 2.2 s, final pulse time 63.8 s. Moreover, MLST analysis was performed following the protocols described on the Pasteur MLST web site (*E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* MLST, www.pasteur.fr/mlst) and Warwick MLST web site (*E. coli* MLST, www.warwick.ac.uk/mlst/).

Plasmid characterization

Plasmid DNA was extracted from one isolate per pulsotype using a Plasmid Midi Kit (Qiagen Inc., CA, USA). Transformations were then carried out using electrocompetent *E. coli* DH5 α as the recipient.¹¹ The resulting transformants were selected on BHI agar plates with colistin (2 mg/L) and screened for *mcr-1* by PCR.³ The antibiotic resistance profile of the transformants was determined according to EUCAST (see above). A PCR-based replicon typing kit (Diateva, Fano, Italy) was used to classify the plasmids according to their incompatibility group.

Results

A total of 195 isolates were obtained from the river and sewage sampling. MALDI-TOF revealed the presence of the following Enterobacteriaceae: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii* and *Enterobacter asburiae*. None of the 105 isolates collected from the rivers was positive for *mcr-1*. On the contrary, 30 of the 90 isolates recovered from the sewage of both WWTPs were positive for *mcr-1*. All the *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae were *E. coli* except one identified as *K. pneumoniae*.

Antibiotic susceptibility testing showed that the 30 isolates exhibited resistance to many antibiotics such as quinolones, aminoglycosides and β -lactams, including third-generation cephalosporins (Table 1). All isolates harboured *bla*_{CTX-M-55} and *bla*_{TEM-1}. Interestingly one of the isolates containing the *mcr-1* gene, BB1459, was susceptible to colistin. The *E. coli* PFGE results revealed two predominant patterns, pulsotype I (12 isolates) and pulsotype II (15 isolates), present in the two WWTPs [Table 1 and Figure S1 (available as Supplementary data at JAC Online)]. MLST was performed in representative *E. coli* isolates from the different

pulsotypes and the *K. pneumoniae* isolate (Figure S1). Twenty-eight *E. coli* (pulsotypes I, II and III) belonged to the same infrequent ST, namely ST1196 following the Warwick MLST scheme, ST632 according to the Pasteur web site. Both ST were recently described and related to nosocomial infections caused by carbapenemase-producing *E. coli*.^{12,13} The non-typeable *E. coli* BB1459 was identified as ST224 or ST479, Warwick and Pasteur schemes, respectively, and the *K. pneumoniae* as ST526.

Plasmids harbouring *mcr-1* from one *E. coli* isolate per pulsotype (corresponding to pulsotypes I, II and III and the non-typeable isolate BB1459) and the *K. pneumoniae* isolate were successfully transformed in *E. coli* DH5 α . All the transformed plasmids belonged to the incompatibility group IncI2 and no coexistence with other antibiotic resistance was observed (Table 1). Although BB1459 was susceptible to colistin, its transformant was resistant to colistin (MIC = 4 mg/L), confirming the functionality of the gene.

Discussion

The discovery of new less toxic drugs, such as aminoglycosides, led to colistin use being restricted to topical treatments in human medicine, while in veterinary medicine the use of colistin was indicated for treatment as well as for the prevention of infections.² The alarming rise of antibiotic resistance along with the scarcity of new drugs is resulting in a lack of effective antibiotics.¹⁴ As such, colistin has been reintroduced in human medicine as a last-resort antibiotic despite its toxicity.³ Until last year, the only known resistance mechanism to colistin was mediated by chromosomal mutations. As mutational mechanisms of resistance are only transmitted vertically, their dissemination has been more confined.³ Nevertheless, Liu et al.³ recently described the first plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-1*, which greatly facilitates the propagation of colistin resistance by horizontal gene transfer. Since then, the presence of *mcr-1* has been reported in many different countries and species, and from a variety of origins.⁴ Our study highlights the elevated prevalence of *mcr-1* in different bacterial species recovered without colistin selection from sewage water around Barcelona.

Aquatic environments play an important role in the dissemination of antibiotic resistance, acting as a reservoir where phenomena such as acquisition, transmission and genetic evolution of resistance genes are frequent.¹⁵ The presence of *mcr-1* in water, and therefore in the environment, not only facilitates the spread of colistin-resistant clones into the population, but also favours the transmission of this gene among different species such as pathogenic *K. pneumoniae*.

Recently, Prim et al.¹⁶ reported plasmid-mediated colistin resistance in 15 clinical strains of *E. coli* isolated from patients of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona. Their study underlines the genetic diversity of *mcr-1*-bearing clones in the hospital.¹⁶ In our study, the colistin resistance gene was present in two predominant *E. coli* clones, two unique *E. coli* as well as in a *K. pneumoniae*. The predominant pulsotypes were isolated from two WWTPs, one (Gavá) serving an area consisting of a number of cities and towns, with a population of 370 000 inhabitants, and the other (el Prat) collecting the sewage from the south of Barcelona city, corresponding to 2 000 000 inhabitants. Because sewage waters comprise a mixture from numerous individuals, our data provide an optimal representation of what is circulating within the human population. In all isolates positive for *mcr-1*, selected in the

Table 1. Epidemiological data and MICs for the 30 isolates positive for *mcr-1* obtained from sewage plants in Barcelona, Spain

| Name | Pulsotype | Source | MIC (mg/L) | | | | | | | | | | | |
|---------------------|--------------|------------|------------|------|-------|-----|------|-----|-------|------|-------|------|-------|-----|
| | | | TMP | NAL | CIP | TET | CHL | AMP | CTX | CAZ | MEM | GEN | TGC | CST |
| BB1418 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1422 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | >8 | <0.03 | >32 | 1 | 4 |
| BB1427 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | 0.5 | 4 |
| BB1430 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | 0.5 | 4 |
| BB1433 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1437 | I | El Prat | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | 1 | 4 |
| BB1438 | I | El Prat | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | 2 | 4 |
| BB1450 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1451 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1452 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | 0.5 | 4 |
| BB1455 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1456 | I | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | 0.5 | 4 |
| BB1420 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1461 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1428 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1429 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | 1 | 4 |
| BB1431 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1434 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1435 | II | El Prat | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | 0.5 | 4 |
| BB1436 | II | El Prat | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | 1 | 8 |
| BB1447 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1448 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1449 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | 0.5 | 4 |
| BB1453 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1454 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1457 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1458 | II | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | >128 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | 0.5 | 4 |
| BB1425 | III | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 4 | <0.03 | >32 | 0.5 | 4 |
| BB1459 | non-typeable | Gavá | >32 | >128 | >8 | >64 | <8 | >64 | >4 | >8 | <0.03 | >32 | 0.5 | <1 |
| BB1460 ^a | ND | Gavá | >32 | >128 | >8 | <2 | <8 | >64 | >4 | 8 | <0.03 | >32 | <0.25 | 4 |
| BB1438T | transformant | — | <0.25 | 64 | <0.06 | <2 | <8 | 2 | <0.25 | <0.5 | <0.03 | <0.5 | <0.25 | 4 |
| BB1460T | transformant | — | <0.25 | 64 | <0.06 | <2 | <8 | 2 | <0.25 | <0.5 | <0.03 | <0.5 | <0.25 | 4 |
| BB1459T | transformant | — | <0.25 | 64 | <0.06 | <2 | <8 | 2 | <0.25 | <0.5 | <0.03 | <0.5 | <0.25 | 4 |
| BB1428T | transformant | — | <0.25 | 64 | <0.06 | <2 | <8 | 2 | <0.25 | <0.5 | <0.03 | <0.5 | <0.25 | 4 |
| BB1425T | transformant | — | <0.25 | 64 | <0.06 | <2 | <8 | 2 | <0.25 | <0.5 | <0.03 | <0.5 | <0.25 | 4 |
| DH5 α | — | laboratory | <0.25 | 64 | <0.06 | <2 | <8 | 2 | <0.25 | <0.5 | <0.03 | <0.5 | <0.25 | <1 |

TMP, trimethoprim; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; TET, tetracycline; CHL, chloramphenicol; AMP, ampicillin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; MEM, meropenem; GEN, gentamicin; TGC, tigecycline; CST, colistin; ND, not determined.

Resistance is highlighted in bold.

^a*K. pneumoniae*.

absence of colistin, the gene was located on an IncI2 plasmid conferring resistance exclusively to colistin. Our results support the notion that a plasmid bearing *mcr-1* is circulating among the population of Barcelona predominantly within two clones, and that it has been transferred to other *E. coli* as well as to other species such as *K. pneumoniae*.

Surveillance of resistance is essential to mitigate the threat of antimicrobial resistance.¹⁷ Because colistin was not used to select the *mcr-1* isolates, our approach allowed detection of a *mcr-1*-positive isolate that was nevertheless susceptible to

colistin. *mcr-1* was harboured on a plasmid that we were able to transform, thereby conferring resistance to colistin. Hence, *mcr-1* can act as a silent antimicrobial resistance gene, evading phenotypic detection, which causes treatment failure and favours its dissemination.^{18,19} This isolate has a different PFGE pattern compared to all the others. Thus, the genetic context of *mcr-1* seems to be responsible for this phenotype. In this sense, we could speculate that either the cell wall structure or the copy number of the *mcr-1* IncI2 plasmid could be the underlying cause of this phenomenon.

The absence of *mcr-1*-bearing isolates in rivers could be due: (i) to the lack of colistin-treated animals/humans contaminating the rivers in these sites; and (ii) to the lower enterobacterial density in river water as compared to sewage. As well as the epidemiological observation of *mcr-1*-positive isolates circulating in the population, the high prevalence of *mcr-1*-positive isolates in sewage is a risk factor promoting the dissemination of this resistance mechanism to environmental water and other ecosystems since sewage treatment processes reduce, but do not remove completely, the antibiotic-resistant bacteria from the final effluent.²⁰ To safeguard the future of colistin, it is essential to adapt a multidisciplinary 'One Health' strategy that should include control measures from the source (i.e. regulating use in human and veterinary medicine) to the sewage (i.e. improving water treatment protocols).

Acknowledgements

We thank N. Montero for her excellent technical assistance and A. Hoefer for carefully reading this manuscript prior to submission.

Funding

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO BES-2015-073164).

Transparency declarations

None to declare.

Author contributions

C. M. O. and J. F. D.-B. designed the study, performed the experiments, analysed and interpreted the results and wrote the draft manuscript. C. M. O. and J. F. D.-B. contributed equally to this work. W. C.-C. and M. M. collected the samples, provided the isolates for this study, and revised and approved the final version of the manuscript. B. G.-Z. conceived, designed and coordinated the study, and revised and approved the final version of the manuscript.

Supplementary data

Figure S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

References

- 1 Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2005; **40**: 1333–41.
- 2 Catry B, Cavaleri M, Baptiste K et al. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **46**: 297–306.
- 3 Liu YY, Wang Y, Walsh TR et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016; **16**: 161–8.
- 4 Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill* 2016; **21**: pii=30155.
- 5 Petrillo M, Angers-Loustau A, Kreysa J. Possible genetic events producing colistin resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect Dis* 2016; **16**: 280–1.
- 6 Zurfuh K, Poirel L, Nordmann P et al. Occurrence of the plasmid-borne *mcr-1* colistin resistance gene in extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in river water and imported vegetable samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 2594–5.
- 7 Di Pilato V, Arena F, Tascini C et al. *mcr-1.2*, a new *mcr* variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 5612–5.
- 8 EUCAST. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, version 6.0, 2016. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf.
- 9 Dallenne C, Da Costa A, Decré D et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 490–5.
- 10 Hidalgo L, Gutierrez B, Ovejero CM et al. *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 from companion animals bearing ArmA methyltransferase, DHA-1 β -lactamase, and QnrB4. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 4532–4.
- 11 Gutierrez B, Escudero JA, San Millan A et al. Fitness cost and interference of Arm/Rmt aminoglycoside resistance with the RsmF housekeeping methyltransferases. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 2335–41.
- 12 Tavares CP, Pereira PS, Marques Ede A et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; **82**: 326–30.
- 13 Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I et al. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 2802–8.
- 14 Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *PT* 2015; **40**: 277–83.
- 15 Marti E, Variatza E, Balcazar JL. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol* 2014; **22**: 36–41.
- 16 Prim N, Rivera A, Rodríguez-Navarro J et al. Detection of *mcr-1* colistin resistance gene in polyclonal *Escherichia coli* isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015. *Euro Surveill* 2016; **21**: pii=30183.
- 17 CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- 18 Enne VI, Delsol AA, Roe JM et al. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3003–10.
- 19 Deekshit VK, Kumar BK, Rai P et al. Detection of class 1 integrons in *Salmonella Weltevreden* and silent antibiotic resistance genes in some seafood-associated nontyphoidal isolates of *Salmonella* in south-west coast of India. *J Appl Microbiol* 2012; **112**: 1113–22.
- 20 Hendricks R, Pool EJ. The effectiveness of sewage treatment processes to remove faecal pathogens and antibiotic residues. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2012; **47**: 289–97.



BIBLIOGRAFÍA

Imagen: Viñeta del comic *True Comics* nº 41, publicado en diciembre de 1944.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham S, Wong HS, Turnidge J, Johnson JR, Trott DJ. Carbapenemase-producing bacteria in companion animals: a public health concern on the horizon. *J Antimicrob Chemother.* 2014. 69:1155-1157.
- Aguayo A, Mella S, Riedel G, Bello H, Domínguez M, González-Rocha G. Colistin in the post-antibiotic era. *Rev Chilena Infectol.* 2016. 33(2):166-76.
- Agwuh KN, MacGowan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *J Antimicrob Chemother.* 2006. 58(2):256-65.
- Al-Marzooq F, Ngeow YF, Tay ST. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing dual carbapenemases (NDM-1 and OXA-232) and 16S rRNA methylase (armA) isolated from a Malaysian patient returning from India. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 45: 445-6.
- Al-Tawfiq JA, Laxminarayan R, Mendelson M. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? *Int J Infect Dis.* 2017. 54:77-84.
- Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Climaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Canton R, da Costa Darini AL, Coque TM. Dissemination of bla(KPC-2) by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011. 55:3579-3583.
- Andrade LN, Vitali L, Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Martinez R, Darini AL. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. *J Clin Microbiol.* 2014. 52:2530-2535.
- Armstrong ES, Kostrub CF, Cass RT, Moser HE, Serio AW, Miller GH. Chapter 7: Aminoglycosides. T.J. Dougherty and M.J. Pucci (eds.). *Antibiotic Discovery and Development.* Springer, 2012.
- Bailey AM, Paulsen IT, Piddock LJV. RamA confers multidrug resistance in *Salmonella enterica* via increased expression of acrB, which is inhibited by chlorpromazine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008. 52:3604-3611.
- Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, Liebana E. bla(CTX-M) genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005. 49:1319-1322.
- Beaucaire G. Does once-daily dosing prevent nephrotoxicity in all aminoglycosides equally? *Clin Microbiol Infect.* 2000. 6(7):357-62.
- Begg E J, Barclay M L. Aminoglycosides--50 years on. *Br J Clin Pharmacol.* 1995. 39(6): 597-603.
- Benveniste R, Davies J. Structure-activity relationships among the aminoglycoside antibiotics: role of hydroxyl and amino groups. *Antimicrob Agents Chemother.* 1973. 4(4):402-9.
- Berrazeg M, Hadjadj L, Ayad A, Drissi M, Rolain JM. First Detected Human Case in Algeria of mcr-1 Plasmid-Mediated Colistin Resistance in a 2011 *Escherichia coli* Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016. 60(11):6996-6997.
- Bialek-Davenet S, Lavigne JP, Guyot K, Mayer N, Tournebise R, Brisse S, Leflon-Guibout V, Nicolas-Chanoine MH. Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015. 70(1):81-8.
- Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res mOpin.* 2015. 31(4):707-21.
- Bollenbach T. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery

and resistance evolution. *Curr Opin Microbiol*. 2015. 27:1-9.

Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Jr., Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009. 48:1-12.

Bradford PA, Jones CH. Chapter 5: Tetracyclines. T.J. Dougherty and M.J. Pucci (eds.). *Antibiotic Discovery and Development*. Springer, 2012.

Brauer A, Telling K, Laht M, Kalmus P, Lutsar I, Remm M, Kisand V, Tenson T. Plasmid with Colistin Resistance Gene *mcr-1* in Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Pig Slurry in Estonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016. 60(11):6933-6936.

Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf.

Brossier F, Veziris N, Aubry A, Jarlier V, Sougakoff W. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol*. 2010. 48(5):1683-9.

Bueno MF, Francisco GR, Cerdeira L, Ienne S, Souza TA, Lincopan N, de Oliveira Garcia D. Draft genome sequence of an aminoglycoside-resistant RmtG-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST235 isolated from a cystic fibrosis patient. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017. 8:106-107.

Bueno MF, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013. 57(5):2397-400.

Cai Y, Lee W, Kwa AL. Polymyxin B versus colistin: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015. 13(12):1481-97.

Cameron A, Gaynor EC. Hygromycin B and apramycin antibiotic resistance cassettes for use in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*. 2014. 9(4):e95084.

Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF. MCR: modern colistin resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017. 36(3):415-420.

Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2008. 14:144-153.

Cantón R. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin Microbiol Infect*. 2009. 15 Suppl 1:20-5.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 2005. 63:219-228.

Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014. 58: 3895-903.

Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*. 2013. 303:298-304.

Carnevali C, Morganti M, Scaltriti E, Bolzoni L, Pongolini S, Casadei G. Occurrence of *mcr-1* in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates Recovered from Humans and Animals in Italy, 2012 to 2015. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016. 60(12):7532-7534.

Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*. 2000. 407(6802):340-8.

Caryl JA, Cox G, Trimble S, O'Neill AJ. "tet(U)" is not a tetracycline resistance determinant. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012. 56(6):3378-9.

Cate JH, Yusupov MM, Yusupova GZ, Earnest TN, Noller HF. X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science*. 1999. 285(5436):2095-104.

Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, Jukes H, Liebana E, Lopez Navas A,

- Mackay D, Magiorakos AP, Moreno Romo MA, Moulin G, Muñoz Madero C, Matias Ferreira Pomba MC, Powell M, Pyörälä S, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Törneke K, van Duijkeren E, Torren Edo J. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrob Agents*. 2015. 46(3):297-306.
- Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, Jukes H, Liebana E, Lopez Navas A, Mackay D, Magiorakos AP, Moreno Romo MA, Moulin G, Muñoz Madero C, Matias Ferreira Pomba MC, Powell M, Pyörälä S, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Törneke K, van Duijkeren E, Torren Edo J. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrob Agents*. 2015. 46: 297-306.
- Cattoir V, Isnard C, Cosquer T, Odhiambo A, Bucquet F, Guérin F, Giard JC. Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015. 59(1):239-44.
- CDC. Antibiotic resistance threats in the United States. Centers for Disease Control and Prevention. 2013. <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
- CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention. 2013.
- Chopra I, Hawkey PM, Hinton M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother*. 1992. 29(3):245-77
- Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001 A. 65(2):232-60.
- Chopra I. Glycylcyclines: third-generation tetracycline antibiotics. *Curr Opin Pharmacol*. 2001 B. 1(5):464-9.
- Chopra I. New developments in tetracycline antibiotics: glycylcyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. *Drug Resist Updat*. 2002. 5(3-4):119-25.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23rd informational supplement. CLSI M100-S023. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013.
- Collignon P. The importance of a One Health approach to preventing the development and spread of antibiotic resistance. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013. 366:19-36.
- Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). Concept paper on use of aminoglycosides in animals in 5 the European Union: development of resistance and 6 impact on human and animal health. European Medicines Agency (EMA). 2014. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/07/WC500170029.pdf
- Conly J, Johnston B. Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005. 16(3):159-60.
- Curcio DJ, Istúriz RE. Tigecycline, the first glycylcycline. *Rev Panm Infectol* 2006. 8(3):35-42.
- Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2010. 65:490-495.
- Darling AE, Mau B, Perna NT. Progressive Mauve: Multiple Genome Alignment with Gene Gain, Loss and Rearrangement. *PLoS ONE*. 2010. 5(6): e111147. doi:10.1371/journal.pone.0011147
- Davies JE. Aminoglycosides: ancient and modern. *J Antibiot (Tokyo)*. 2006. 59:529-32.
- Day MJ, Rodríguez I, van Essen-Zandbergen A, Dierikx C, Kadlec K, Schink AK, Wu G, Chattaway MA, DoNascimento V, Wain J, Helmuth R, Guerra B, Schwarz S, Threlfall J, Woodward MJ, Coldham N, Mevius D, Woodford N. Diversity of STs, plasmids and ESBL genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in Germany,

the Netherlands and the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2016. 71(5):1178-82.

De Majumdar S, Veleba M, Finn S, Fanning S, Schneiders T. Elucidating the Regulon of Multidrug Resistance Regulator RarA in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013. 57:1603-1609.

Deekshit VK, Kumar BK, Rai P, Srikumar S, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection of class 1 integrons in *Salmonella* Weltevreden and silent antibiotic resistance genes in some seafood-associated nontyphoidal isolates of *Salmonella* in south-west coast of India. *J Appl Microbiol.* 2012. 112: 1113-22.

Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, Fortunato S, Giani T, Menichetti F, Rossolini GM. mcr-1.2, a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016. 60(9):5612-5.

Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, Fortunato S, Giani T, Menichetti F, Rossolini GM. mcr-1.2, a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016. 60:5612-5.

Diaz-Torres ML, McNab R, Spratt DA, Villedieu A, Hunt N, Wilson M, Mullany P. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003. 47(4):1430-2. TET37

Dijkmans AC, Wilms EB, Kamerling IM, Birkhoff W, Ortiz-Zacarias NV, van Nieuwkoop C, Verbrugh HA, Touw DJ. Colistin: Revival of an Old Polymyxin Antibiotic. *Ther Drug Monit.* 2015. 37(4):419-27.

Do Monte DF, Mem A, Fernandes MR, Cerdeira L, Esposito F, Galvão JA, Franco BD, Lincopan N, Landgraf M. Chicken Meat as Reservoir of Colistin-Resistant *Escherichia coli* Carrying mcr-1 Genes in South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017.

Dobner P, Bretzel G, Rüscher-Gerdes S, Feldmann K, Rifai M, Löscher T, Rinder H. Geographic

variation of the predictive values of genomic mutations associated with streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Probes.* 1997. 11:123-6.

Dodds DR. Antibiotic resistance; a current epilogue. *Biochem Pharmacol.* 2016

Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007. 51(3):852-6.

Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am.* 2016. 30(2):523-37.

Domenico F. Classification Framework and Chemical Biology of Tetracycline-Structure-Based Drugs. *Antibiotics.* 2012. 1:1-13

Donati V, Feltrin F, Hendriksen RS, Svendsen CA, Cordaro G, García-Fernández A, Lorenzetti S, Lorenzetti R, Battisti A, Franco A. Extended-spectrum-beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and plasmid mediated quinolone resistance in *Klebsiella* spp. from companion animals in Italy. *PLoS One.* 2014. 9:e90564.

Duffy B, Holliger E, Walsh F. Streptomycin use in apple orchards did not increase abundance of mobile resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2014. 350(2):180-9.

Dunkle JA, Vinal K, Desai PM, Zelinskaya N, Savic M, West DM, Conn GL, Dunham CM. Molecular recognition and modification of the 30S ribosome by the aminoglycoside-resistance methyltransferase NpmA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014. 111(17):6275-80.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority) and EMA (European Medicines Agency). ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. Stockholm/Parma/London: ECDC/EFSA/EMA, 2015. EFSA Journal 2015 A. 13(1):4006, 114 pp.

- Economou V, Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect Drug Resist.* 2015. 8:49-61.
- EFSA, ECDC. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. 2016
- El Garch F, Sauget M, Hocquet D, LeChaudée D, Woehrle F, Bertrand X. mcr-1 is borne by highly diverse *Escherichia coli* isolates since 2004 in food-producing animals in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2017. 23(1):51.
- EMA. Use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. European Medicines Agency. 2013.
- Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM. Evidence of Antibiotic Resistance Gene Silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006. 50: 3003-10.
- Ermak G, Cancasci VJ, Davies KJ. Cytotoxic effect of doxycycline and its implications for tet-on gene expression systems. *Anal Biochem.* 2003. 318(1):152-4.
- EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Versión 6.0. EUCAST. 2016.
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/
- European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. Stockholm: ECDC B.2015.
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect.* 2009.73:345-354.
- Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 2005. 40: 1333-41.
- Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev.* 2016. 29: 321-47.
- FDA. FDA Approved Drug Products, Tygacil. Full prescribing information. 2016.
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/021821s039lbl.pdf
- Feldman MB, Terry DS, Altman RB, Blanchard SC. Aminoglycoside activity observed on single pre-translocation ribosome complexes. *Nat Chem Biol.* 2010. 6(3):244.
- Ferdous M, Zhou K, Mellmann A, Morabito S, Croughs PD, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, Rossen JW, Friedrich AW. Is Shiga Toxin-Negative *Escherichia coli* O157:H7 Enteropathogenic or Enterohemorrhagic *Escherichia coli*? Comprehensive Molecular Analysis Using Whole-Genome Sequencing. *J Clin Microbiol.* 2015. 53: 3530-8.
- Fiedler S, Bender JK, Klare I, Halbedel S, Grohmann E, Szewzyk U, Werner G. Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium* is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants tet(L) and tet(M). *J Antimicrob Chemother.* 2016. 71(4):871-81.
- Fiedler S, Bender JK, Klare I, Halbedel S, Grohmann E, Szewzyk U, Werner G. Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium* is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants tet(L) and tet(M). *J Antimicrob Chemother.* 2016. 71(4):871-81.
- Filgona J, Banerjee T, Anupurba S. Incidence of the novel rmtF and rmtG methyltransferases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from a hospital in India. *J Infect Dev Ctries.* 2015. 9(9):1036-9.
- Fischel-Ghodsian N. Genetic factors in aminoglycoside toxicity. *Pharmacogenomics.* 2005. 6(1):27-36.
- Fontes LC, Neves PR, Oliveira S, Silva KC, Hachich EM, Sato MI, Lincopan N. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo- β -lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011. 55(6):3063-4.
- Forsberg KJ, Patel S, Wencewicz TA, Dantas G. The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating Enzymes. *Chem Biol.* 2015. 22(7):888-97.

- Fourmy D, Yoshizawa S, Puglisi JD. Paromomycin binding induces a local conformational change in the A-site of 16 S rRNA. *J Mol Biol.* 1998. 277(2):333-45.
- Freeman CD, Nicolau DP, Belliveau PP, Nightingale CH. Once-daily dosing of aminoglycosides: review and recommendations for clinical practice. *J Antimicrob Chemother.* 1997. 39(6):677-86.
- Galani I, Anagnostoulis G, Chatzikonstantinou M, Petrikos G, Souli M. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing OXA-48, CTX-M-15, and ArmA in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 2016.
- Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother.* 2011. 66(9):2070-4.
- Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003. 47:2565-71
- Gamal D, Fernández-Martínez M, Salem D, El-Defrawy I, Montes LÁ, Ocampo-Sosa AA, Martínez-Martínez L. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Egypt containing blaNDM-1 on IncR plasmids and its association with rmtF. *Int J Infect Dis.* 2016. 43:17-20.
- Garneau-Tsodikova S, Labby KJ. Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *Medchemcomm.* 2016. 7(1):11-27.
- Gary P. Wormser, Charles Stratton; Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition Edited by Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, and Michael A. Pfaller. American Society for Microbiology, 2007 2488 pp. libro
- Gelband H, Delahoy M. Policies to address antibiotic resistance in low-and middle-income countries, national and international action on antimicrobial resistance.: Center for Disease Dynamics, Economics & Policy, 2014.
- Gerrits MM, Berning M, Van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. Effects of 16S rRNA gene mutations on tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003. 47(9):2984-6.
- Granier SA, Hidalgo L, Millan AS, Escudero JA, Gutierrez B, Brisabois A, Gonzalez-Zorn B. ArmA Methyltransferase in a Monophasic *Salmonella enterica* Isolate from Food. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011. 55:5262-5266.
- Gregory ST, Carr JF, Rodriguez-Correa D, Dahlberg AE. Mutational analysis of 16S and 23S rRNA genes of *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol.* 2005. 187(14):4804-12.
- Grill MF, Maganti RK. Neurotoxic effects associated with antibiotic use: management considerations. *Br J Clin Pharmacol.* 2011. 72(3):381-93
- Grossman TH. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016. 6(4).
- Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2004. 54:321-332.
- Guillaume G, Ledent V, Moens W, Collard JM. Phylogeny of efflux-mediated tetracycline resistance genes and related proteins revisited. *Microb Drug Resist.* 2004. 10(1):11-26.
- Guo L, An J, Ma Y, Ye L, Luo Y, Tao C, Yang J. Nosocomial Outbreak of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese Hospital: Clonal Transmission of ST147 and ST383. *PLoS One.* 2016. 11:e0160754.
- Gutierrez B, Escudero JA, San Millan A, Hidalgo L, Carrilero L, Ovejero CM, Santos-Lopez A, Thomas-Lopez D, Gonzalez-Zorn B. Fitness cost and interference of Arm/Rmt aminoglycoside resistance with the RsmF housekeeping methyltransferases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012. 56: 2335-41.
- Hartl R, Kerschner H, Lepuschitz S, Ruppitsch W, Allerberger F, Apfalter P. Detection of the mcr-1 gene in a multidrug-resistant *Escherichia coli* isolate from an Austrian patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017.
- Hauser AR. Antibiotics that Block Protein Production. K. Scogna, S. Rhyner (eds.).

- Antibiotic Basics for Clinicians, the ABCs of choosing the right antibacterial agent. 2013. 6:53-80.
- Hendricks R, Pool EJ. The effectiveness of sewage treatment processes to remove faecal pathogens and antibiotic residues. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2012; 47:289-97.
- Henley CM, Schacht J. Pharmacokinetics of aminoglycoside antibiotics in blood, inner-ear fluids and tissues and their relationship to ototoxicity. *Audiology*. 1988. 27(3):137-46.
- Hentschke M, Wolters M, Sobottka I, Rohde H, Aepfelbacher M. ramR Mutations in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* with Reduced Susceptibility to Tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010. 54:2720-2723.
- Hidalgo L, Gutierrez B, Ovejero CM, Carrilero L, Matrat S, Saba CKS, Santos-Lopez A, Thomas-Lopez D, Hoefer A, Suarez M, Santurde G, Martin-Espada C, Gonzalez-Zorn B. *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 11 from Companion Animals Bearing ArmA Methyltransferase, DHA-1 beta-Lactamase, and QnrB4. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013. 57:4532-4534.
- Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, Prasad KN, Woodford N, Gonzalez-Zorn B. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2013. 68: 1543-50.
- Hirata T, Saito A, Nishino K, Tamura N, Yamaguchi A. Effects of efflux transporter genes on susceptibility of *Escheichia coli* to tigecycline (GAR-936). *Antimicrob Agents Chemother*. 2004. 48:2179-2184.
- Ho PL, Ng KY, Lo WU, Law PY, Lai EL, Wang Y, Chow KH. Plasmid-Mediated OqxAB Is an Important Mechanism for Nitrofurantoin Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015. 60(1):537-43.
- Hoang P, Salbu RL. Updated Nitrofurantoin Recommendations in the Elderly: A Closer Look at the Evidence. *Consult Pharm*. 2016. 31(7):381-4.
- Hobbie SN, Akshay S, Kalapala SK, Bruell CM, Shcherbakov D, Böttger EC. Genetic analysis of interactions with eukaryotic rRNA identify the mitoribosome as target in aminoglycoside ototoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. 105(52):20888-93.
- Hopkins KL, Escudero JA, Hidalgo L, Gonzalez-Zorn B. 16S rRNA methyltransferase RmtC in *Salmonella enterica* serovar Virchow. *Emerg Infect Dis*. 2010. 16(4):712-5.
- Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Scott G, Livermore DM, Woodford N. Emergence of AcrAB-mediated tigecycline resistance in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* during ciprofloxacin treatment. *Int J Antimicrob Agents*. 2010. 35(5):478-81.
- Houghton JL, Green KD, Chen W, Garneau-Tsodikova S. The future of aminoglycosides: the end or renaissance? *Chembiochem*. 2010. 11(7):880-902.
- Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006. 70(2):140-50.
- Janosi L, Hara H, Zhang S, Kaji A. Ribosome recycling by ribosome recycling factor (RRF)--an important but overlooked step of protein biosynthesis. *Adv Biophys*. 1996. 32:121-201
- Javan AO, Shokouhi S, Sahraei Z. A review on colistin nephrotoxicity. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015. 71(7):801-10.
- Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents*. 2017. pii: S0924-8579(17)30032-8.
- Johanesen PA, Lyras D, Bannam TL, Rood JL. Transcriptional analysis of the tet(P) operon from *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*. 2001. 183(24):7110-9. TETP
- Johnson A. A. Bryskier (eds.). *Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals*. ASM Press. 2005.
- Johnson TJ, Lang KS. IncA/C plasmids: An emerging threat to human and animal health? *Mob Genet Elements*. 2012. 2:55-58.

- Jose PA, Jebakumar SR. Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. *Front Microbiol.* 2013.4:240.
- Kaewpoowat Q, Ostrosky-Zeichner L. Tigecycline: a critical safety review. *Expert Opin Drug Saf.* 2015. 14(2):335-42.
- Kappagoda S, Singh U, Blackburn BG. Antiparasitic therapy. *Mayo Clin Proc.* 2011. 86(6):561-83.
- Karaiskos I, Souli M, Galani I, Giamarellou H. Colistin: still a lifesaver for the 21st century? *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017. 13(1):59-71.
- Kaye KS, Pogue JM, Tran TB, Nation RL, Li J. Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 2016. 30(2):391-414.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 2012. 28: 1647-9.
- Kluytmans-van den Bergh MF, Rossen JW, Bruijning-Verhagen PC, Bonten MJ, Friedrich AW, Vandenbroucke-Grauls CM, Willems RJ, Kluytmans JA. Whole genome multilocus sequence typing of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2016. 54(12):2919-2927.
- Kocsis B, Kocsis E, Fontana R, Cornaglia G, Mazzariol A. Identification of blaLAP-2 and qnrS1 genes in the internationally successful Klebsiella pneumoniae ST147 clone. *J Med Microbiol.* 2013. 62:269-273.
- Kondo S, Hotta K. Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: Development and enzymatic modifications. *J Infect Chemother.* 1999. 5(1):1-9.
- Kotwani A, Holloway K. Access to antibiotics in New Delhi, India: implications for antibiotic policy. *J Pharm Policy Pract* 2013; 6: 6.
- Kumar SG, Adithan C, Harish BN, Sujatha S, Roy G, Malini A.. Antimicrobial resistance in India: A review. *J Nat Sci Biol Med.* 2013. 4: 286-91.
- Labro MT, Bryskier JM. Antibacterial resistance: an emerging 'zoonosis'? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014. 12:1441-1461.
- Lan Yu, Xiangyun Yan, Long Wang, Ju Chu, Yingping Zhuang, Siliang Zhang, Meijin Guo. Molecular cloning and functional characterization of an ATP-binding cassette transporter OtrC from Streptomyces rimosus. *BMC Biotechnol.* 2012. 12: 52.
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012. 9: 357-9.
- Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JD. Surveillance and molecular epidemiology of Klebsiella pneumoniae isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013. 57:130-136.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 2013. 13: 1057-98.
- Leclercq R, Cantón R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.* 2013. 19(2):141-60.
- Leclercq SO, Wang C, Zhu Y, Wu H, Du X, Liu Z, Feng J. Diversity of the Tetracycline Mobilome within a Chinese Pig Manure Sample. *Appl Environ Microbiol.* 2016. 82(21):6454-6462. Tet59
- Lee CS, Li JJ, Doi Y. Complete sequence of conjugative IncA/C plasmid encoding CMY-2 β -lactamase and RmtE 16S rRNA methyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015. 59(7):4360-1.
- Lee CS, Vasoo S, Hu F, Patel R, Doi Y. Klebsiella pneumoniae ST147 coproducing NDM-7 carbapenemase and RmtF 16S rRNA

- methyltransferase in Minnesota. *J Clin Microbiol.* 2014. 52(11):4109-10.
- Lee CS, Vasoo S, Hu F, Patel R, Doi Y. Klebsiella pneumoniae ST147 coproducing NDM-7 carbapenemase and RmtF 16S rRNA methyltransferase in Minnesota. *J Clin Microbiol.* 2014. 52: 4109-10.
- Lee HB, Kim Y, Kim JC, Choi GJ, Park SH, Kim CJ, Jung HS. Activity of some aminoglycoside antibiotics against true fungi, *Phytophthora* and *Pythium* species. *J Appl Microbiol.* 2005. 99:836-43.
- Lee JY, Park YK, Chung ES, Na IY, Ko KS. Evolved resistance to colistin and its loss due to genetic reversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.* 2016. 6:25543.
- Leigue L, Warth JF, Melo LC, Silva KC, Moura RA, Barbato L, Silva LC, Santos AC, Silva RM, Lincopan N. MDR ST2179-CTX-M-15 *Escherichia coli* co-producing RmtD and AAC(6')-Ib-cr in a horse with extraintestinal infection, Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2015. 70(4):1263-5.
- Leski TA, Bangura U, Jimmy DH, Ansumana R, Lizewski SE, Stenger DA, Taitt CR, Vora GJ. Multidrug-resistant tet(X)-containing hospital isolates in Sierra Leone. *Int J Antimicrob Agents.* 2013. 42(1):83-6.
- Li XZ, Nikaido H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria An Update. *Drugs.* 2009. 69:1555-1623.
- Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs.* 2004. 64(2):159-204.
- Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs.* 2009. 69(12):1555-623.
- Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2015. 28(2):337-418.
- Liassine N, Assouvie L, Descombes MC, Tendon VD, Kieffer N, Poirel L, Nordmann P. Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract Enterobacteriaceae in Switzerland. *Int J Infect Dis.* 2016. 51:4-5.
- Linkevicius M, Sandegren L, Andersson DI. Potential of Tetracycline Resistance Proteins To Evolve Tigecycline Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015. 60(2):789-96.
- Liu JH, Deng YT, Zeng ZL, Gao JH, Chen L, Arakawa Y, Chen ZL. Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008. 52(8):2992-3.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016. 16(2):161-8.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016. 16: 161-8.
- Livermore DM. Tigecycline: what is it, and where should it be used? *J Antimicrob Chemother.* 2005. 56:611-614.
- Lloyd DH. Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. *Clin Infect Dis.* 2007. 45:S148-S152.
- Loho T, Dharmayanti A. Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections. *Acta Med Indones.* 2015. 47(2):157-68.
- Loncaric I, Beiglböck C, Feßler AT, Posautz A, Rosengarten R, Walzer C, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S, Spargser J, Kübber-Heiss A. Characterization of ESBL- and AmpC-Producing and Fluoroquinolone-Resistant Enterobacteriaceae Isolated from Mouflons (*Ovis orientalis musimon*) in Austria and Germany. *PLoS One.* 2016. 11:e0155786.
- M Castanheira, Lm Deshpande, Rg Melano, Re Mendes, Rn Jones Jmi Characterization of Two

- New Variants of 16S rRNA Methylase Encoding Genes, rmtB2 and rmtB3 Laboratories, North Liberty, Iowa, USA; Public Health Laboratory, Toronto, Canada poster eccmid 2012
- Maaland MG, Papich MG, Turnidge J, Guardabassi L. Pharmacodynamics of doxycycline and tetracycline against *Staphylococcus pseudintermedius*: proposal of canine-specific breakpoints for doxycycline. *J Clin Microbiol*. 2013. 51(11):3547-54.
- Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev*. 2005. 105(2):477-98.
- Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev*. 2011. 24:718-733.
- Marti E, Variatza E, Balcazar JL. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol*. 2014. 22: 36-41.
- Matheson, A. T., Moore, P.B. y Noller, H.F. The ribosome : structure, function, antibiotics, and cellular interactions. ASM Press, 2000. Libro
- Matt T, Ng CL, Lang K, Sha SH, Akbergenov R, Shcherbakov D, Meyer M, Duscha S, Xie J, Dubbaka SR, Perez-Fernandez D, Vasella A, Ramakrishnan V, Schacht J, Böttger EC. Dissociation of antibacterial activity and aminoglycoside ototoxicity in the 4-monosubstituted 2-deoxystreptamine apramycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. 109(27):10984-9.
- McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2002. 40:443–65
- McWilliam SJ, Antoine DJ, Smyth RL, Pirmohamed M. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity in children. *Pediatr Nephrol*. 2016.
- Mega WM, Doyle-Eisele M, Cass RT, Kostrub CF, Sherwood RL, Metz MA, Cirz RT. Plazomicin is effective in a non-human primate pneumonic plague model. *Bioorg Med Chem*. 2016. 24:6429-6439.
- Meinersmann RJ, Ladely SR, Bono JL, Plumblee JR, Hall MC, Genzlinger LL, Cook KL. Complete Genome Sequence of a Colistin Resistance Gene (mcr-1)-Bearing Isolate of *Escherichia coli* from the United States. *Genome Announc*. 2016. 4(6).
- Meinersmann RJ, Ladely SR, Plumblee JR, Cook KL, Thacker E. Prevalence of mcr-1 in the Cecal Contents of Food Animals in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017. 61(2).
- Michalopoulos AS, Falagas ME. Colistin: recent data on pharmacodynamics properties and clinical efficacy in critically ill patients. *Ann Intensive Care*. 2011. 1(1):30.
- Michalova E, Novotna P, Schlegelova J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Vet Med* 2004. 3:79-100
- Modificacion table Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001 C. 65(2):232-60. Originally modified from MMBR 2001. 65; 232-260 with permission from ASM Journals
- Mohr AM, Sifri ZC, Horng HS, Sadek R, Savetamal A, Hauser CJ, Livingston DH. Use of aerosolized aminoglycosides in the treatment of Gram-negative ventilator-associated pneumonia. *Surg Infect (Larchmt)*. 2007. 8(3):349-57.
- Mohr KI. History of Antibiotics Research. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016. 398:237-272.
- Mohsin M, Raza S, Roschanski N, Guenther S, Ali A, Schierack P. Description of the First *Escherichia coli* Clinical Isolate Harboring the Colistin Resistance Gene mcr-1 from the Indian Subcontinent. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016. 61(1).
- Moleres J, Santos-López A, Lázaro I, Labairu J, Prat C, Ardanuy C, González-Zorn B, Aragon V, Garmendia J. Novel bla_{ROB}-1-bearing plasmid conferring resistance to β -lactams in *Haemophilus parasuis* isolates from healthy weaning pigs. *Appl Environ Microbiol*. 2015. 81:3255-3267.
- Montgomerie JZ. Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. *Rev Infect Dis*. 1979. 1:736-753.
- Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K,

- Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013. 13:785-796.
- Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013. 13:785-96.
- Nelson ML, Leby SB. Tetracyclines and Tetracycline derivatives. Murray Moo-Young (ed.). *Comprehensive Biotechnology*. 2011. 3.25:269-283
- Nelson ML, Leby SB. The history of the tetracyclines. *Ann N Y Acad Sci*. 2011. 1241:17-32.
- Nelson ML. The chemistry and cellular biology of the tetracyclines. M. Nelson, W. Hillen, R.A. Greenwald. *Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicina*. 2001
- Nielsen LE, Snesrud EC, Onmus-Leone F, Kwak YI, Avilés R, Steele ED, Sutter DE, Waterman PE, Lesho EP. IS5 element integration, a novel mechanism for rapid in vivo emergence of tigecycline nonsusceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014. 58(10):6151-6.
- Nikaido H, Pagès JM. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2012. 36(2):340-63.
- Nikaido H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 2011. 77:1-60.
- Nonaka L, Connell SR, Taylor DE. 16S rRNA Mutations That Confer Tetracycline Resistance in *Helicobacter pylori* Decrease Drug Binding in *Escherichia coli* Ribosomes. *J Bacteriol*. 2005. 187(11): 3708–3712.
- Nonaka L, Suzuki S. New Mg²⁺-dependent oxytetracycline resistance determinant tet 34 in *Vibrio* isolates from marine fish intestinal contents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002. 46(5):1550-2.
- O'Hara JA, McGann P, Snesrud EC, Clifford RJ, Waterman PE, Lesho EP, Doi Y. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013. 57(5):2413-6.
- Oishi N, Talaska AE, Schacht J. Ototoxicity in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2012. 42(6):1259-71.
- Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014. 5: 643.
- Oliveira JFP, Cipullo JP, Burdmann EA. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Braz J Cardiovasc Surg* 2006. 21(4): 444-452
- Olliver A, Vallé M, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with IS1 or IS10 elements in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005. 49(1):289-301.
- Ortega-Paredes D, Barba P, Zurita J. Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador. *Epidemiol Infect*. 2016. 144(14):2967-2970.
- Osei Sekyere J. Current State of Resistance to Antibiotics of Last-Resort in South Africa: A Review from a Public Health Perspective. *Front Public Health*. 2016. 30; 4:209.
- Osei Sekyere J. Current State of Resistance to Antibiotics of Last-Resort in South Africa: A Review from a Public Health Perspective. *Front Public Health*. 2016. 4:209.
- Oung HM, Lin KC, Wu TM, Chandrika NN, Hong CY. Hygromycin B-induced cell death is partly mediated by reactive oxygen species in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol*. 2015. 89(6):577-88.
- Ovejero CM, Delgado-Blas JF, Calero-Caceres W, Muniesa M, Gonzalez-Zorn B. Spread of *mcr-1*

- carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2017.
- Park SR, Park JW, Ban YH, Sohng JK, Yoon YJ. 2-Deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics: recent advances in the characterization and manipulation of their biosynthetic pathways. *Nat Prod Rep.* 2013. 30(1):11-20.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005. 18:657
- Paterson DL, Robson JM, Wagener MM. Risk factors for toxicity in elderly patients given aminoglycosides once daily. *J Gen Intern Med.* 1998. 13(11):735-9.
- Peleg AY, Potoski BA, Rea R, Adams J, Sethi J, Capitano B, Husain S, Kwak EJ, Bhat SV, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report. *J Antimicrob Chemother.* 2007. 59(1):128-31.
- Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23rd informational supplement. CLSI M100-S023.: Clinical and Laboratory Standards Institute , Wayne, PA., 2013.
- Perret LJ, Tait CP. Non-antibiotic properties of tetracyclines and their clinical application in dermatology. *Australas J Dermatol.* 2014. 55(2):111-8.
- Petersen PJ, Jacobus NV, Weiss WJ, Sum PE, Testa RT. In vitro and in vivo antibacterial activities of a novel glycylcycline, the 9-t-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). *Antimicrob Agents Chemother.* 1999. 43(4):738-44.
- Peterson LR. A review of tigecycline - the first glycylcycline. *Int J Antimicrob Agents.* 2008. 32:S215-S222.
- Peterson LR. A review of tigecycline--the first glycylcycline. *Int J Antimicrob Agents.* 2008. 32 Suppl 4:S215-22.
- Petrillo M, Angers-Loustau A, Kreysa J. Possible genetic events producing colistin resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect Dis.* 2016. 16: 280-1.
- Piepersberg W. Streptomycin and related aminoglycosides. *Biotechnology.* 1995. 28:531-70.
- Piffaretti JC. Antibiotic resistance: the emergence of plasmid-mediated colistin resistance enhances the need of a proactive one-health approach. *FEMS Microbiol Lett.* 2016. 363(5).
- Pilo P, Vogt D, Origgi FC, Endimiani A, Peterson S, Perreten V. First report of a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 11 causing sepsis in a free-ranging beaver (*Castor fiber*). *Environ Microbiol Rep.* 2015. 7:351-353.
- Pintado V. Old and new antibiotics for therapy of multidrug resistant bacteria. *Rev Esp Quimioter.* 2016. 29 Suppl 1:39-42.
- Pioletti M, Schlünzen F, Harms J, Zarivach R, Glühmann M, Avila H, Bashan A, Bartels H, Auerbach T, Jacobi C, Hartsch T, Yonath A, Franceschi F. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J.* 2001. 20(8):1829-39.
- Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 2008. 8:159-166.
- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998.11:589-603.
- Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 a. 49(2):479-87.
- Poole K. J Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005 b. 56(1):20-51.
- Pournaras S, Koumaki V, Spanakis N, Gennimata V, Tsakris A. Current perspectives on tigecycline resistance in Enterobacteriaceae: susceptibility testing issues and mechanisms of resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2016. 48(1):11-8.
- Prasad P, Sun J, Danner RL, Natanson C. Excess deaths associated with tigecycline after approval based on noninferiority trials. *Clin Infect Dis.* 2012. 54(12):1699-709.

- Prayle A, Watson A, Fortnum H, Smyth A. Side effects of aminoglycosides on the kidney, ear and balance in cystic fibrosis. *Thorax*. 2010. 65(7):654-8.
- Prim N, Rivera A, Rodríguez-Navarro J, Español M, Turbau M, Coll P, Mirelis B. Detection of mcr-1 colistin resistance gene in polyclonal *Escherichia coli* isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015. *Euro Surveill*. 2016. 21.
- Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, Gales AC, Pignatari AC. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Braz J Med Biol Res*. 2015. 48: 174-7.
- Raggi D, Giannatempo P, Miceli R, Farè E, Piva L, Basoni D, Catanzaro M, Torelli T, Stagni S, Marongiu M, Gianni AM, Nicolai N, Salvioni R, Necchi A. Etoposide, Methotrexate, and Dactinomycin Alternating With Cyclophosphamide and Vincristine (EMACO) for Male Patients With HCG-expressing, Chemoresistant Germ Cell Tumors. *Am J Clin Oncol*. 2017. 40(1):60-65.
- Rahman M, Prasad KN, Pathak A, Pati BK, Singh A, Ovejero CM, Ahmad S, Gonzalez-Zorn B. RmtC and RmtF 16S rRNA Methyltransferase in NDM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Emerg Infect Dis*. 2015. 21(11):2059-62.
- Rahman YE, Cerny EA, Tollaksen SL, Wright BJ, Nance SL, Thomson JF. Liposome-encapsulated actinomycin D: potential in cancer chemotherapy. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1974. 146(4):1173-6.
- Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. 2010. 13(6):151-71.
- Recht MI, Douthwaite S, Puglisi JD. Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO J*. 1999. 18(11):3133-8.
- REGLAMENTO (UE) No 37/2010 DE LA COMISIÓN
- REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2015/151 DE LA COMISIÓN
- Reynolds LJ, Roberts AP, Anjum MF. Efflux in the Oral Metagenome: The Discovery of a Novel Tetracycline and Tigecycline ABC Transporter. *Front Microbiol*. 2016. 7:1923. Tetab60
- Rhouma M, Beaudry F, Letellier A. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int J Antimicrob Agents*. 2016. b. 48(2):119-26.
- Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front Microbiol*. 2016 a. 7:1789.
- Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008. 197:1079-1081.
- Roberts MC. Tetracycline therapy: update. *Clin Infect Dis*. 2003. 36(4):462-7.
- Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, Cohen J, Findlay D, Gyssens I, Heuer OE, Kahlmeter G, Kruse H, Laxminarayan R, Liébana E, López-Cerero L, MacGowan A, Martins M, Rodríguez-Baño J, Rolain JM, Segovia C, Sigauque B, Tacconelli E, Wellington E, Vila J. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect*. 2015. 6: 22-9.
- Rodrigues C, Machado E, Ramos H, Peixe L, Novais Â. Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK). *Int J Med Microbiol*. 2014. 304:1100-1108.
- Rolain JM, Kempf M, Leangapichart T, Chabou S, Olaitan AO, Le Page S, Morand S, Raoult D. Plasmid-Mediated mcr-1 Gene in Colistin-Resistant Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in France and Laos. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016. 60(11):6994-6995.
- Rubin JE, Peirano G, Peer AK, Govind CN, Pitout JD. NDM-1-producing Enterobacteriaceae from South Africa: moving towards endemicity? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014. 79(3):378-80.
- Rubin JE, Pitout JD. Extended-spectrum β -lactamase, carbapenemase and AmpC producing Enterobacteriaceae in companion animals. *Vet Microbiol*. 2014. 170:10-18.

- Ruiz J, Pons MJ, Gomes C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2012. 40(3):196-203.
- Ruzin A, Immermann FW, Bradford PA. Real-time PCR and statistical analyses of *acrAB* and *ramA* expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008. 52:3430-3432.
- Ruzin A, Visalli MA, Keeney D, Bradford PA. Influence of transcriptional activator *RamA* on expression of multidrug efflux pump *AcrAB* and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005. 49:1017-1022.
- Sabirova JS, Xavier BB, Coppens J, Zarkotou O, Lammens C, Janssens L, Burggrave R, Wagner T, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Whole-genome typing and characterization of *bla*VIM19-harboring ST383 *Klebsiella pneumoniae* by PFGE, whole-genome mapping and WGS. *J Antimicrob Chemother*. 2016. 71(6):1501-9.
- Saenz Y, Brinas L, Dominguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004. 48:3996-4001.
- Saiprasad P V, Krishnaprasad K. Exploring the hidden potential of fosfomycin for the fight against severe Gram negative infections. *Indian J Med Microbiol* 2016;34:416420.
- Savic M, Lovric J, Tomic TI, Vasiljevic B, Conn GL. Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res*. 2009. 37(16):5420-31.
- Schwarz S, Johnson AP. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother*. 2016. 71(8):2066-70.
- Sebek O K. Chapter 9: Polymyxins and Criculin. David Gottlieb and Paul D Shaw (eds.) *Antibiotics, Mechanism of Action*. Springer, 1967.
- Seputiene V, Povilonis J, Armalyte J, Suziedelis K, Pavilonis A, Suziedeliene E. Tigecycline - how powerful is it in the fight against antibiotic-resistant bacteria? *Medicina (Kaunas)*. 2010. 46(4):240-8.
- Sheng ZK, Hu F, Wang W, Guo Q, Chen Z, Xu X, Zhu D, Wang M. Mechanisms of tigecycline resistance among *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014. 58(11):6982-5.
- Sidjabat HE, Townell N, Nimmo GR, George NM, Robson J, Vohra R, Davis L, Heney C, Paterson DL. Dominance of IMP-4-producing enterobacter cloacae among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Australia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015. 59(7):4059-66.
- Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro surveill*. 2016. 21: pii=30155
- Sonnevend Á, Ghazawi A, Alqahtani M, Shibl A, Jamal W, Hashmey R, Pal T. Plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* from the Arabian Peninsula. *Int J Infect Dis*. 2016. 50:85-90.
- Speer BS, Bedzyk L, Salyers AA. Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. *J Bacteriol*. 1991. 173(1):176-83.
- Stein GE, Babinchak T. Tigecycline: an update. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013. 75:331-336.
- Stockwell VO, Duffy B. Use of antibiotics in plant agricultura. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*. 2012. 31 (1), 199-210.
- Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Scheufen S, Hassdenteufel E, Guenther S, Bethe A, Pfeifer Y, Ewers C. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *J Antimicrob Chemother*. 2013. 68:2802-8
- Sun H, Ting L1, Machineni S, Praestgaard J, Kuemmell A, Stein DS, Sunkara G, Kovacs SJ, Villano S, Tanaka SK. Randomized, Open-Label Study of the Pharmacokinetics and Safety of Oral and Intravenous Administration of Omadacycline to Healthy Subjects. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016. 60(12):7431-7435.

- Sun Y, Cai Y, Liu X, Bai N, Liang B, Wang R. The emergence of clinical resistance to tigecycline. *Int J Antimicrob Agents*. 2013. 41(2):110-6.
- Sun Y, Cai Y, Liu X, Bai N, Liang BB, Wang R. The emergence of clinical resistance to tigecycline. *Int J Antimicrob Agents*. 2013. 41:110-116.
- Syed MI, Ilan O, Nassar J, Rutka JA. Intratympanic therapy in Meniere's syndrome or disease: up to date evidence for clinical practice. *Clin Otolaryngol*. 2015. 40(6):682-90.
- Taber HW, Mueller JP, Miller PF, Arrow AS. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev*. 1987. 51(4):439-57.
- Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Mishra SK, Ohara H, Shimada K, Kirikae T, Pokhrel BM. Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (ArmA, RmtC and RmtF) in Nepal. *Int J Antimicrob Agents*. 2013. 42(4):372-4.
- Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med*. 2015. 277: 501-12.
- Tängdén T. Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Ups J Med Sci*. 2014. 119(2):149-53.
- Tavares CP, Pereira PS, Marques Ede A, Faria C Jr, de Souza Mda P, de Almeida R, Alves Cde F, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-Klebsiella pneumoniae) isolated from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015. 82: 326-30.
- Teo JW, Tan TM, Poh CL. Genetic determinants of tetracycline resistance in *Vibrio harveyi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002. 46(4):1038-45.
- Tessier PR, Nicolau DP. Tigecycline displays in vivo bactericidal activity against extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae after 72-hour exposure period. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(1):640-2.
- Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright GD. The tetracycline resistome. *Cell. Mol. Life Sci*. 2010. 67:419–431.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0. 2016.
- Tige
- Tijet N, Andres P, Chung C, Lucero C; WHONET-Argentina Group, Low DE, Galas M, Corso A, Petroni A, Melano RG. rmtD2, a new allele of a 16S rRNA methylase gene, has been present in Enterobacteriaceae isolates from Argentina for more than a decade. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011. 55(2):904-9.
- Trimble MJ, Mlynářčik P, Kolář M, Hancock RE. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016. 6(10).
- Tsai A, Uemura S, Johansson M, Puglisi EV, Marshall RA, Aitken CE, Korlach J, Ehrenberg M, Puglisi JD. The impact of aminoglycosides on the dynamics of translation elongation. *Cell Rep*. 2013. 3(2):497-508.
- Turnidge J. Pharmacodynamics and dosing of aminoglycosides. *Infect Dis Clin North Am*. 2003. 17(3):503-28
- Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012. 25: 682-707.
- Umezawa H, Ueda M, Maeda K, Yagishita K, Kondo S, Okami Y, Utahara R, Osato Y, Nitta K, Takeuchi T. Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. *J Antibiot (Tokyo)*. 1957. 10(5):181-8.
- V. Solovyev, A Salamov. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies* (Ed. R.W. Li), Nova Science Publishers, p. 61-78. 2011.
- Vaara M. Polymyxins and their novel derivatives. *Curr Opin Microbiol*. 2010. 13(5):574-81.

- Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev.* 2003. 16(3):430-50.
- Vardakas KZ, Rellos K, Triarides NA, Falagas ME. Colistin loading dose: evaluation of the published pharmacokinetic and clinical data. *Int J Antimicrob Agents.* 2016. 48(5):475-484.
- Veleba M, Higgins PG, Gonzalez G, Seifert H, Schneiders T. Characterization of RarA, a Novel AraC Family Multidrug Resistance Regulator in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012a. 56:4450-4458.
- Veleba M, Schneiders T. Tigecycline Resistance Can Occur Independently of the ramA Gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012b. 56:4466-4467.
- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015. 40(4):277-83.
- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015. 40: 277-83.
- Vicens Q, Westhof E. Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding a site. *Chem Biol.* 2002. 9(6):747-55.
- Vicens Q, Westhof E. Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding a site. *Chem Biol.* 2002. 9(6):747-55.
- Vicente D, Pérez-Trallero E. Tetracyclines, sulfonamides, and metronidazole. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010. 28(2):122-30.
- Villa L, Feudi C, Fortini D, García-Fernández A, Carattoli A. Genomics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 512 clone highlights the role of RamR and ribosomal S10 protein mutations in conferring tigecycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014. 58(3):1707-12.
- Vojtová V, Urbánek K. Pharmacokinetics of tetracyclines and glycylicyclines. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2009. 15(1):17-21.
- Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat.* 2012. 15(3):133-48.
- Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat.* 2012. 15: 133-48.
- Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Shibata N, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007. 51(12):4401-9.
- Wailan AM, Sidjabat HE, Yam WK, Alikhan NF, Petty NK, Sartor AL, Williamson DA, Forde BM, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walsh TR, Partridge SR. Mechanisms Involved in Acquisition of blaNDM Genes by IncA/C2 and IncFIY Plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016. 60(7):4082-8.
- Waites KB, Crabb DM, Liu Y, Duffy LB. In Vitro Activities of Omadacycline (PTK 0796) and Other Antimicrobial Agents against Human Mycoplasmas and Ureaplasmas. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016. 60(12):7502-7504.
- Waksman SA, Woodruff HB. Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produced by a Soil Actinomyces. *J. Bact.* 1940. 45:2,609-614
- Wang L, Pulk A, Wasserman MR, Feldman MB, Altman RB, Cate JH, Blanchard SC. Allosteric control of the ribosome by small-molecule antibiotics. *Nat Struct Mol Biol.* 2012. 19(9):957-63.
- Wang W, Guo Q, Xu X, Sheng ZK, Ye X, Wang M. High-level tetracycline resistance mediated by efflux pumps Tet(A) and Tet(A)-1 with two start codons. *J Med Microbiol.* 2014. 63:1454-9.
- Wang Y, Zhang R, Li J, Wu Z, Yin W, Schwarz S, Tyrrell JM, Zheng Y, Wang S, Shen Z, Liu Z, Liu J, Lei L, Li M, Zhang Q, Wu C, Zhang Q, Wu Y, Walsh TR, Shen J. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nat Microbiol.* 2017. 2:16260.

- Warburton PJ, Ciric L, Lerner A, Seville LA, Roberts AP, Mullany P, Allan E. TetAB46, a predicted heterodimeric ABC transporter conferring tetracycline resistance in *Streptococcus australis* isolated from the oral cavity. *J Antimicrob Chemother.* 2013. 68(1):17-22.
- Wattal C, Goel N. Tackling antibiotic resistance in India. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014. 12: 1427-40.
- Wei DD, Wan LG, Yu Y, Xu QF, Deng Q, Cao XW, Liu Y. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase, carbapenemase, and plasmid quinolone determinants in *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying distinct types of 16S rRNA methylase genes, and their association with mobile genetic elements. *Microb Drug Resist.* 2015. 21(2):186-93.
- Weinstein Mj, Luedemann Gm, Oden Em, Wagman Gh, Rosselet Jp, Marquez Ja, Coniglio Ct, Charney W, Herzog Hl, Black J. Gentamicin, a new antibiotic complex from micromonospora. *J Med Chem.* 1963. 6:463-4.
- Wertheim H, Van Nguyen K, Hara GL, Gelband H, Laxminarayan R, Mouton J, Cars O. Global survey of polymyxin use: A call for international guidelines. *J Glob Antimicrob Resist.* 2013. 1(3):131-134
- White RJ. Chapter 1: The Early History of Antibiotic Discovery: Empiricism Ruled T.J. Dougherty and M.J. Pucci (eds.). *Antibiotic Discovery and Development.* Springer, 2012.
- WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. 2014
- WHO. Critically important antimicrobials for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use. Report of the second WHO expert meeting, Copenhagen 2007. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43765/1/9789241595742_eng.pdf
- Wohlwend N, Endimiani A, Francey T, Perreten V. Third-generation-cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from humans and companion animals in Switzerland: spread of a DHA-producing sequence type 11 clone in a veterinary setting. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015. 59:2949-2955.
- Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 2016. 21(27).
- Xia J, Sun J, Li L, Fang LX, Deng H, Yang RS, Li XP, Liao XP, Liu YH. First Report of the Inc11/ST898 Conjugative Plasmid Carrying *rmtE2* 16S rRNA Methyltransferase Gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015. 59(12):7921-2.
- Xie J, Talaska AE, Schacht J. New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. *Hear Res.* 2011. 281(1-2):28-37.
- Xu G, Jiang Y, An W, Wang H, Zhang X. Emergence of KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in an urban river in Harbin, China. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015. 31(9):1443-50.
- Yanat B, Machuca J, Yahia RD, Touati A, Pascual Á, Rodríguez-Martínez JM. First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate in Algeria. *Int J Antimicrob Agents.* 2016. 48(6):760-761.
- Yao J, Moellering R. *Manual of Clinical Microbiology.* Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition Edited by Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, and Michael A. Pfaller. American Society for Microbiology, 2007. Libro
- Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* 2003. 362(9399):1888-93.
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012. 67: 2640-4.
- Zarubica T, Baker MR, Wright HT, Rife JP. The aminoglycoside resistance methyltransferases from the ArmA/Rmt family operate late in the 30S ribosomal biogenesis pathway. *RNA.* 2011. 17(2):346-55.

Zhanel GG, Lawson CD, Zelenitsky S, Findlay B, Schweizer F, Adam H, Walkty A, Rubinstein E, Gin AS, Hoban DJ, Lynch JP, Karlowsky JA. Comparison of the next-generation aminoglycoside plazomicin to gentamicin, tobramycin and amikacin. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012. 10(4):459-73.

Zhijie Xu, Yuanliang Yan, Zhi Li, Long Qian, Zhicheng Gong. The Antibiotic Drug Tigecycline: A Focus on its Promising Anticancer Properties. *Front Pharmacol*. 2016. 7: 473.

Zhong X, Xu H, Chen D, Zhou H, Hu X, Cheng G. First emergence of *acrAB* and *oqxAB* mediated tigecycline resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* pre-dating the use of tigecycline in a Chinese hospital. *PLoS One*. 2014. 9(12).

Zhou K, Ferdous M, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, Grundmann H, Friedrich AW, Rossen JW. The mosaic genome structure and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 is driven by short-term adaptation. *Clin Microbiol Infect*. 2015. 21: 468.e7-18.

Zorov DB. Amelioration of aminoglycoside nephrotoxicity requires protection of renal mitochondria. *Kidney Int*. 2010. 77(10):841-3.

Zurfluh K, Glier M, Hächler H, Stephan R. Replicon typing of plasmids carrying *bla*CTX-M-15 among Enterobacteriaceae isolated at the environment, livestock and human interface. *Sci Total Environ*. 2015. 521-522:75-8.

Zurfluh K, Jakobi G, Stephan R, Hächler H, Nüesch-Inderbinnen M. Replicon typing of plasmids carrying *bla* CTX-M-1 in Enterobacteriaceae of animal, environmental and human origin. *Front Microbiol*. 2014. 5:555.

Zurfluh K, Poirel L, Nordmann P, Nüesch-Inderbinnen M, Hächler H, Stephan R. Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016. 60: 2594-5.

